

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES**  
**DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE**

**ELISA DE ALMEIDA NEVES AZEVEDO**

**ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA E PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA DA  
VIA MAPK EM MONÓCITOS FRENTE À INFECÇÃO POR ZIKV**

**RECIFE**  
**2019**

**ELISA DE ALMEIDA NEVES AZEVEDO**

**ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA E PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA  
MAPK EM MONÓCITOS FRENTE À INFECÇÃO POR ZIKV**

Tese apresentada ao Doutorado em  
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do  
Instituto Aggeu Magalhães para defesa e  
obtenção do título de Doutora em Ciências.

**Área de Concentração:** Imunopatogênese  
de doenças crônicas e infecciosas.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Clarice Neuenschwander Lins de Moraes.

Coorientadores: Dr. Rafael Freitas de Oliveira França.

Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Junior.

RECIFE

2019

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães**

---

A994a      Azevedo, Elisa de Almeida Neves.

Atividade pró-inflamatória e perfil da expressão gênica da via MAPK em monócitos frente à infecção por ZIKV / Elisa de Almeida Neves Azevedo. - Recife: [s.n.], 2019.

112 p. : il., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

Orientadora: Clarice Neuenschwander Lins de Moraes; coorientadores: Rafael Freitas de Oliveira França, Ernesto Torres de Azevedo Marques Junior.

1. Zika virus. 2. Imunidade inata. 3. MAPK. I. Moraes, Clarice Neuenschwander Lins de. II. França, Rafael Freitas de Oliveira. III. Marques Junior, Ernesto Torres de Azevedo. IV. Título.

CDU 578

---

## **ELISA DE ALMEIDA NEVES AZEVEDO**

### **ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA E PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA MAPK EM MONÓCITOS FRENTE À INFECÇÃO POR ZIKV**

Tese apresentada ao Doutorado em  
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do  
Instituto Aggeu Magalhães para defesa e  
obtenção do título de Doutora em Ciências.

**Área de Concentração:** Imunopatogênese  
de doenças crônicas e infecciosas.

Aprovada em: 30 de setembro de 2019.

#### **BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup> Virginia Maria Barros de Lorena  
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

---

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos  
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

---

Dr<sup>a</sup> Isabelle Freire Tabosa Viana  
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

---

Dr. Rodrigo Antonio Peliciari-Garcia  
Universidade Federal de São Paulo-SP

---

Dr<sup>a</sup> Clarice Neuenschwander Lins de Moraes  
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

*À Marta, Almira e Amanda com todo amor do mundo.*

## AGRADECIMENTOS

Sou grata por todo aprendizado que foi oferecido a mim ao longo dessa jornada e agradeço, da maneira mais sincera, a todos que contribuíram para que esse sonho fosse realizado.

Agradeço a Deus por ter colocado pessoas no meu caminho, que por muitas vezes confundi com anjos.

À Clarice, por todo carinho, cuidado e afeto ao longo desses dez anos. Por todo ensinamento, pelos conselhos e principalmente, acreditar em mim. Todo seu incentivo foi fundamental para a minha formação e perseverança.

A Rafael, por todo conhecimento compartilhado, paciência, conselhos e cervejas.

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições.

Aos anjos que por vezes chamei de amigos: Leila, Lili, Morganna, Renan, Fernando, Armando, Gabi, Peu, Thaíse, Débora, Valter, Deborah, Ju, Ira, Priscila, Thais, Sayonara.

A todos os amigos que fazem do Lavite uma família, Verônica, Dóris, Clintiano, Laura, Dhalia, Roberto, Barto, Fábila, Marília, Bia, Diégina, Dra Marli, Tâmisia, Amanda, Lucas, Rafa, Manu, Ademir, Jefferson, Willy, Bruno, Catarina, Claudio, Livia, Carol, Isabelle, Andreza, Priscilla, Klarissa e aos demais que por ventura esqueci de nomea-los.

A Fiocruz por toda infraestrutura e por ser minha segunda casa durante muitos anos e aos meus amigos que ganhei graças a essa instituição maravilhosa: Renan, Sávio, Veruska, Gabriel, Lígia, Ana Vírgina, Heytor, Raul, João, Camila, Simone, Duschinka, Joelma, Renato entre tantos outros.

Aos meus amigos de vida, Thalita, Camila, Rafael, Alváro, Rodrigo, Katarina, Igor, Diego, Rafaela, Peixe, Marcela, Baltar, Guilherme, Victor, Fábio.

À minha enorme família, a todos os tios, tias, primos, primas e “agregados” em particular Luiza, a princesa Helena e Suely, vocês são fundamentais para minha construção. Agradeço especialmente, aos meus primos irmãos; Artur, Amanda, Carol e Henrique por estarem sempre ao meu lado.

À minha avó Almira, que continua me acompanhando do lugar que estiver e me ensinou alçar voos cada vez mais altos e longe. A senhora foi e sempre será a minha maior escola.

À minha mãe, por me ensinar todos os dias o que é superação, dedicação e amor. Sem você nada disso existiria. Muito obrigada por tudo! Por acreditar em mim, por ver solução em tudo, pelo amor incondicional. Você é o melhor da minha vida, meu amor e minha fortaleza.

*“Só sei que nada sei”.*

*Socrátes*



AZEVEDO, Elisa de Almeida Neves. Atividade pró-inflamatória e perfil da expressão gênica da via MAPK em monócitos frente à infecção por ZIKV. 2019. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

## RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) demonstrou, nos últimos anos, um relevante potencial de iniciar epidemias. Devido à grande quantidade de casos de ZIKV confirmados em vários países em todo mundo e a sua relação com distúrbios neurológicos, ficou evidente a importância de se estudar os mecanismos envolvidos na infecção viral. Entretanto, as vias de sinalização envolvidas na resposta imune contra o ZIKV ainda não estão bem elucidadas. O presente estudo avaliou a ativação das vias de sinalização JAK/STAT e MAPK em células monocíticas (THP-1) infectadas com ZIKV. Foi demonstrado que células THP-1 são suscetíveis a infecção do ZIKV e apresentam um perfil de morte celular intensa após 48 horas de infecção. Uma vez infectadas pelo ZIKV, a expressão gênica de PI3K, Akt e NF- $\kappa$ B é aumentada, a fosforilação de p38MAPK, ERK1/2, STAT1, STAT3, STAT5 e STAT6 é induzida e a produção de IL-6, IL-8, CXCL9, CCL2, CCL5 e CXCL10 é ativada, havendo uma modulação imunológica de acordo com o tempo pós infecção. Além disso, a inibição de p38MAPK induziu a diminuição dos níveis de IL-8 e CXCL10, sugerindo que a regulação dessas citocinas dependem, parcialmente, da via de sinalização MAPK. Mais estudos são necessários para caracterizar as vias de sinalização da imunidade inata frente a infecção do ZIKV.

Palavras-chave: Vírus Zika. Imunidade inata. MAPK.

AZEVEDO, Elisa de Almeida Neves. Proinflammatory activity and profile of gene expression of the MAPK pathway in monocytes against ZIKV infection. 2019. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

### **ABSTRACT**

Zika virus (ZIKV) has shown a relevant potential for initiating epidemics in recent years. Due to the large number of confirmed ZIKV cases in various countries around the world and their relationship to neurological disorders, the importance of studying the mechanisms involved in viral infection has become evident. However, the signaling pathways involved in the immune response against ZIKV are not yet well understood. The present study evaluated the activation of JAK / STAT and MAPK signaling pathways in ZIKV-infected monocytic cells (THP-1). THP-1 cells have been shown to be susceptible to ZIKV infection and to have an intense cell death profile 48 hours after infection. Once infected with ZIKV, PI3K, Akt and NF- $\kappa$ B gene expression increases, phosphorylation of p38MAPK, ERK1 / 2, STAT1, STAT3, STAT5 and STAT6 is induced, and IL-6 production is activated. IL-8, CXCL9, CCL2, CCL5 and CXCL10 with immunological modulation according to time after infection. In addition, inhibition of p38MAPK induced a decrease in IL-8 and CXCL10 levels, suggesting that the regulation of these cytokines partly depends on the MAPK signaling pathway. Further studies are needed to characterize innate immunity signaling pathways against ZIKV infection.

Key word: Zika virus. Immunity innate. Mitogen Activated Protein Kinase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Distribuição dos países com a presença do ZIKV .....	20
Figura 2-	Casos prováveis de doença aguda pelo vírus Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2018 e 2019.....	22
Figura 3-	Estrutura do Vírus Zika e seu genoma.....	24
Figura 4-	Ciclo Replicativo dos Flavivírus .....	26
Figura 5-	Vias de Sinalização dos IFNs tipo I.....	37
Figura 6-	Via de Sinalização MAPK .....	41
Figura 7-	Marcação da proteína E do ZIKV em THP-1.....	57
Figura 8-	Ensaio de Placa dos sobrenadantes das células THP-1.....	58
Figura 9-	Microscopia de campo claro das THP-1 infectadas.....	61
Figura 10-	Fosforilação de p38MAPK em células THP-1 infectadas com ZIKV	64
Figura 11-	Fosforilação de p38MAPK em células THP-1 infectadas com ZIKV	65
Figura 12-	Histograma e gráfico das células THP-1 marcadas com anticorpo para ERK1/2, na presença e na ausência do ZIKV 30mpi, 45mpi e 60mpi .....	67
Figura 13-	Histogramas e gráficos das células THP-1 marcadas com anticorpo para as STATs, na presença e na ausência do ZIKV 30mpi, 45 mpi e 60mpi.....	68

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Curva da Carga Viral em THP-1 infectadas com diferentes MOIs do ZIKV .....	58
Gráfico 2-	Percentual de morte das células THP-1 infectadas com diferentes MOIs do ZIKV .....	59
Gráfico 3-	Taxa de viabilidade das células THP-1 infectadas.....	60
Gráfico 4-	Expressão de genes da via MAPK em células THP-1 após 6 horas da infecção pelo ZIKV.....	62
Gráfico 5-	Expressão de genes da via MAPK em células THP-1 após 12 horas da infecção pelo ZIKV.....	63
Gráfico 6-	Dosagem de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em células THP-1 infectadas pelo ZIKV .....	71
Gráfico 7-	Quantificação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em células THP-1 infectadas pelo ZIKV tratadas com inibidor de p38MAPK .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7AAD	7-aminoactinomicina D
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBA	<i>Cytometric Beads Assay</i>
CCL	<i>CC chemokine ligand</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>Complementary desoxirribonucleic Acid</i>
Célula Th	Célula T <i>helper</i>
CHKV	Vírus Chikungunya
CMC	Carboximetilcelulose
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CTNBio	Comissão Nacional de Biossegurança
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DENV	Vírus Dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxirribonucleic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
hpi	Horas pós-infecção
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IFNAR	Receptores de IFN-I
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
IRES	<i>Interferon-Stimulated Response Elements</i>
IRF-3	<i>Interferon regulatory factor</i> IRF-3
ISGF3	<i>IFN-stimulated gene factor 3</i>
ISGs	<i>Interferon-stimulated gene</i>
JAK	Tirosinas Quinases de Janus
JNK	<i>c-Jun amino-terminal kinase</i>

LAVITE	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MDA-5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIG	<i>Monokine induced by gamma interferon</i>
MIP-1 $\beta$	<i>Macrophage inflammatory protein-1 <math>\beta</math></i>
MKKK	<i>MAPK kinase kinase</i>
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
MPI	Minutos pós infecção
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MTT	<i>Methylthiazoletetrazolium</i>
NCR	<i>Non Coding Region</i>
NF-kB.	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	<i>Natural killer</i>
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
NS	<i>Nonstructural</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PRNT	<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
RIG-1	<i>Retinoic Acid-Inducible Gene-1</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RT-qPCR	<i>Real-time reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SBG	Síndrome Guillain-Barré
SCZ	Síndrome Congênita do Zika
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema nervoso central
STAT	Ativadores da Transdução de Sinal da Transcrição
TBT	<i>Tris-buffered saline</i>
TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Tyk2	Tirosina Kinase 2
UFP	Unidades formadoras de placa

WNV	<i>West Nile Virus</i>
YFV	<i>Yellow Fever Virus</i>
ZIKV	<i>Zika Virus</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 REFERENCIAL TEORICO</b> .....	<b>19</b>
2.1 Epidemiologia do Vírus Zika .....	19
2.2 Vírus Zika .....	22
2.3 Ciclo de Replicação Viral .....	24
2.4 Manifestações Clínicas .....	26
2.4.1 <u>Microcefalia</u> .....	27
2.4.2 <u>Anormalidades Oftalmológicas</u> .....	28
2.4.3 <u>Síndrome de Guillain-Barré</u> .....	28
2.5 Transmissão .....	29
2.6 Diagnóstico.....	30
2.7 Tratamento e Prevenção.....	31
2.8 Imunidade inata e ZIKV .....	32
2.8.1 <u>Via de sinalização do INTERFERON</u> .....	35
2.8.2 <u>Via de Sinalização JAK/STAT</u> .....	37
2.8.3 <u>Via das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno (MAPK)</u> .....	39
2.9 Células permissivas a infecção do ZIKV .....	42
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>44</b>
<b>4 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>45</b>
4.1 Objetivos Específicos .....	45
<b>5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	<b>46</b>
5.1 Descrição do local de experimentação.....	46
5.2 Cultivo de células VERO.....	46
5.3 Produção de Estoque Viral.....	46
5.4 Titulação Viral.....	47
5.5 Cultivo das células THP-1.....	47
5.6 Infecção das células THP-1 .....	47
5.7 Ensaio de Placa .....	48
5.8 Extração do RNA viral.....	48
5.9 RT-qPCR.....	48
5.10 Imunofluorescência.....	49
5.11 Marcação AnexinaV/ 7AAD.....	49
5.12 Ensaio MTT- Methylthiazoletetrazolium .....	50



5.13 Extração de RNA celular e síntese do DNA complementar .....	50
5.14 Expressão gênica .....	51
5.15 Fosforilação de p38 MAPK .....	52
5.16 Immunoblot.....	52
5.17 Fosforilação das proteínas da via MAPK e JAK/STAT .....	53
5.18 Inibição de p38 MAPK.....	54
5.19 <i>Cytometric Beads Assay</i> (CBA) .....	54
5.20 Considerações éticas.....	54
5.21 Análise estatística .....	55
6 RESULTADOS.....	56
6.1 As células THP-1 são suscetíveis à infecção do ZIKV .....	56
6.2 A viabilidade de células THP-1 diminui durante a infecção pelo ZIKV .....	59
6.3 As THP-1 infectadas com ZIKV superexpressam genes da via de NF-kB....	61
6.4 As THP-1 infectadas com ZIKV apresentam maior fosforilação de p38MAPK.....	65
6.5 O ZIKV interfere na fosforilação de STATs e ERK1/2 em THP-1 .....	66
6.6 A inibição de p38MAPK nas células THP-1 infectadas com o ZIKV interfere nos níveis de IL-8 e CXCL10.....	71
7 DISCUSSÃO .....	75
8 CONCLUSÕES .....	81
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXO A- DENGUE VIRUS-SPECIFIC ANTIBODIES ENHANCE BRAZILIAN ZIKA VIRUS INFECTION.....	92
ANEXO B- ENHANCEMENT OF ZIKA INFECTION BY DENGUE- SPECIFIC ANTIBODIES DOES NOT ALTER THE PRODUCTION OF INTERLEUKIN 6 IN FCGR3-EXPRESSING K562 CELLS.....	97
ANEXO C- THE TRANSCRIPTIONAL AND PROTEIN PROFILE FROM HUMAN INFECTED NEUROPROGENITOR CELLS IS STRONGLY CORRELATED TO ZIKA VIRUS MICROCEPHALY CYTOKINES PHENOTYPE EVIDENCING A PERSISTENT INFLAMMATION IN THE CNS.....	99

## 1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV), recebe esse nome devido ao local onde foi isolado de primatas pela primeira vez, a Floresta Zika, em Uganda no ano de 1947. Alguns anos mais tarde, em 1952, houve relato de infecção pelo ZIKV em humanos, na África Oriental (DICK, 1952; SMITHBURN, 1954). Inicialmente acreditava-se que o vírus era responsável por infecções esporádicas e com manifestação clínica branda. Porém com os surtos que aconteceram na Micronésia (em 2007) e Polinésia Francesa (em 2013-2014), apresentando relatos de complicações neurológicas, esse perfil da infecção mudou radicalmente (OEHLER et al., 2014).

Assim como outros flavivírus, o ZIKV pertence a família *Flaviviridae*, socioeconomicamente falando, um grupo importante de patógenos associados a doenças infecciosas em todo o mundo, gerando uma alta taxa de morbidade e mortalidade populacional. Seu genoma é constituído de RNA não segmentado, de cadeia simples e senso positivo (KUNO et al., 1998; MARANO et al., 2016). Codifica uma poliproteína com mais de 3.000 aminoácidos, posteriormente clivada em três proteínas estruturais: o capsídeo (C), a precursora de membrana (prM) e o envelope (E), e sete proteínas não-estruturais, que são: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (LINDENBACH et al., 2013).

De 2013 a 2017, 31 países e territórios notificaram casos de microcefalia e outras malformações do sistema nervoso central associadas à infecção pelo ZIKV, principalmente, na América Central e do Sul (EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2017). Em 2015, o Ministério da Saúde do Brasil (Secretaria de Vigilância – SVS/MS) começou a registrar um número cada vez maior de uma doença exantemática no Nordeste brasileiro. A partir de então, começou-se a averiguar a origem dos surtos e se os sinais relatados eram ocasionados por chikungunya, dengue ou rubéola. Os resultados concluíram que não se tratava de infecção por estes agentes patogênicos e, logo depois, o ZIKV foi isolado em Natal, capital do Rio Grande do Norte (SLAVOV et al., 2016).

No início de 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) determinou estado de emergência de importância internacional no Brasil, devido ao alto número de casos de infecção e uma intensa relação entre as desordens neurológicas e anomalias congênitas que aumentaram recentemente no país. Pernambuco e Paraíba foram os estados brasileiros com maior número de casos relatados (BRITO, 2015).

A transmissão do ZIKV ocorre pelos mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente, pelo *Aedes. Aegypti*. A fêmea do *Aedes* ao realizar hematofagia, introduz o vírus na pele humana, seguida pela infecção de células sanguíneas permissivas, como por exemplo monócitos (BRIANT et al., 2014). Alguns estudos também indicam que o ZIKV pode ser transmitido verticalmente e sexualmente (ATKINSON et al., 2016; BESNARD et al., 2014).

Os sintomas da infecção pelo ZIKV são semelhantes aos observados em infecções pelo vírus dengue (DENV) e pelo vírus Chikungunya (CHKV), porém febre baixa, erupções cutâneas com duração entre 4 e 7 dias, dor de cabeça e prurido estão associadas a infecção pelo ZIKV (LANCIOTTI et al., 2008). Devido a sintomatologia semelhante a de outras arboviroses, o exame clínico apenas, não garante o seu diagnóstico. Porém o diagnóstico diferencial não se restringe apenas aos arbovírus, devendo ser incluídos rubéola, leptospirose, malária, parvovírus, rickettsioses e outros patógenos causadores de artrite (BACHILLER-LUQUE et al., 2016).

O teste diagnóstico definitivo para infecção pelo ZIKV é baseado na detecção do RNA viral nos fluídos corpóreos por RT-PCR, seguida por sequenciamento ou através do isolamento viral (BACHILLER-LUQUE et al., 2016). Testes sorológicos para pesquisas de anticorpos também podem ser utilizados, no entanto, após a fase aguda, estes são comprometidos pela reatividade cruzada com anticorpos para outros flavivírus, podendo ocorrer resultados falsos positivos com infecção passada pelo DENV ou vírus da Febre Amarela (YFV, do inglês, *Yellow Fever Virus*) (BARSARAB et al., 2016).

Quanto aos aspectos imunológicos envolvidos na infecção do ZIKV ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas. Alguns estudos vêm demonstrando que na ativação da resposta imune inata no contexto da infecção pelo ZIKV, seja por ativação de células como monócitos, seja pela indução de citocinas e quimiocinas (FOO et al., 2017).

A fase aguda da infecção pelo ZIKV é associada a perfis de resposta imunológica do tipo Th1, Th2, Th17 e Th9 e que as citocinas mais presentes nessa resposta, são as interleucinas (IL) IL-6, IL-8, IL-10 e IL-13 (TAPPE et al., 2019; ORNELAS et al., 2016). A principal via de resposta imunológica ativada na infecção do ZIKV é a via do interferon-I (IFN-I). Essa ativação é decorrente da presença do material genético viral detectado pelos Receptores semelhantes a Toll (*Toll Like*

*Receptors*, TLR). A cascata de sinais subsequentes ativa o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e o fator regulatório de IFN 3 (IRF3) que resultará na produção de IFN-I, induzindo um estado antiviral (LESTER; LI, 2013; KUMAR et al., 2016; LERAT et al., 2017;). No entanto, o ZIKV tem apresentado mecanismos de evasão e inibição das respostas antivirais, devido a interações dos receptores da via do IFN-I e algumas de suas proteínas não estruturais (NS1 e NS5).

Pouco se sabe acerca da biologia do ZIKV, principalmente no que diz respeito a maneira de como o vírus utiliza dos mecanismos celulares para produção da progênie viral e estabelecimento de um processo infeccioso. Como também vias imunológicas envolvidas na resposta à infecção e evasão viral. Por isso, são necessários estudos que permitam a melhor compreensão sobre a interação vírus-hospedeiro, vias de sinalização celular e formas de tratamento. Nesse sentido, o atual projeto visa estudar alguns dos mecanismos imunológicos utilizados pelo ZIKV e dessa maneira contribuir com a descoberta de novos alvos terapêuticos.

## 2 REFERENCIAL TEORICO

O vírus Zika (ZIKV) foi isolado pela primeira vez em 1947, de um macaco sentinela, durante uma pesquisa de febre amarela, na Floresta Zika, em Uganda. Posteriormente, foi isolado em mosquitos *Aedes africanus*, em 1948. Depois de isolado em humanos em 1952, alguns casos esporádicos de infecção pelo ZIKV foram relatados na África e depois no Sudeste da Ásia (DICK, 1952).

### 2.1 Epidemiologia do Vírus Zika

Durante 60 anos após o descobrimento do ZIKV foram notificados apenas 14 casos de infecção humana. Até que em 2007, foram relatados casos de infecção pelo ZIKV fora da África, causando uma epidemia na Ilha de Yap, na Microésia. Alguns anos depois, em 2013, um grande surto de ZIKV ocorreu na região do Pacífico Ocidental, afetando aproximadamente 29.000 pessoas distribuídas em diversas ilhas. Ainda durante esta epidemia, a Polinésia Francesa foi alvo de um aumento de 20 vezes na incidência de casos da Síndrome de Guillain-Barré, surgindo então a primeira relação da infecção por ZIKV com quadros neurológicos. Algumas análises filogenéticas do vírus foram realizadas e curiosamente foi observada uma relação genética entre as cepas da Polinésia Francesa e da Ilha de Yap (HADDOW et al., 2012; MACNAMARA, 1954; OEHLER et al., 2014). Também em 2013, foi relatado pela primeira vez a infecção pelo ZIKV na Europa, em que um viajante alemão que retornava da Tailândia, teve os anticorpos anti-ZIKV detectados no seu sangue (TAPPE et al., 2014).

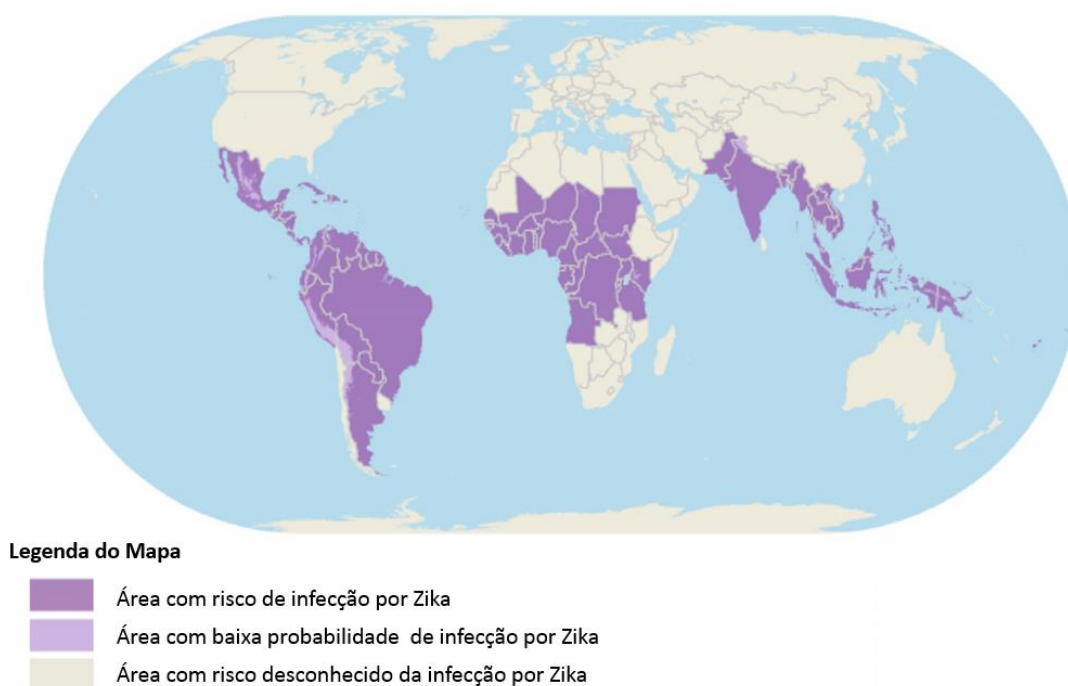
Em 2014, 1500 casos foram registrados no arquipélago de Nova Caledônia, na Oceania, originados de cepas da Polinésia Francesa (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2015). Em 2015 foi confirmada a presença do ZIKV na Ilha de Páscoa e um pouco mais tarde em áreas não endêmicas como Japão, Itália e Canadá (FONSECA et al., 2014; KUTSUNA et al., 2014; ZAMMARCHI et al., 2015).

No início de 2015, o Ministério da Saúde brasileiro confirmou transmissão autóctone do ZIKV no Brasil e começou a monitorar o número crescente de uma doença exantemática na região do Nordeste brasileiro e a investigar a possível causa dos surtos. A hipótese inicial era que os sintomas relatados tivessem relação com infecções pelos DENV, vírus da rubéola ou CHIKV, porém em março do mesmo ano

o ZIKV foi isolado em Natal, excluindo as hipóteses preliminares (BRITO, 2015). Análises filogenéticas das sequências das amostras de ZIKV obtidas nesses surtos, demonstraram que o subtipo circulante no nordeste do Brasil caracterizava-se como agrupados da cepa asiática (ZANLUCA; SANTOS, 2016). Em dezembro de 2015, vários países da América Latina, como por exemplo, Paraguai, Colômbia, Venezuela também reportaram casos de infecção pelo vírus (HAMEL et al., 2015).

A infecção pelo ZIKV tem apresentado uma epidemia histórica com grande disseminação mundial, estando presente em mais de 70 países, principalmente, naqueles das Américas Central e do Sul (Figura 1) (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2018). Mais de 30 países relataram casos de alterações no SNC associados ao ZIKV, sendo o Brasil, o maior em número de casos reportados. Até janeiro de 2017, 72 países descreveram sinais de transmissão autóctone do vírus enquanto 13 países reportaram sinais de transmissão entre pessoas, em que se acredita que dentre essa forma de difusão a mais evidente seja, provavelmente, pela via sexual (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

**Figura 1- Distribuição dos países com a presença do ZIKV**



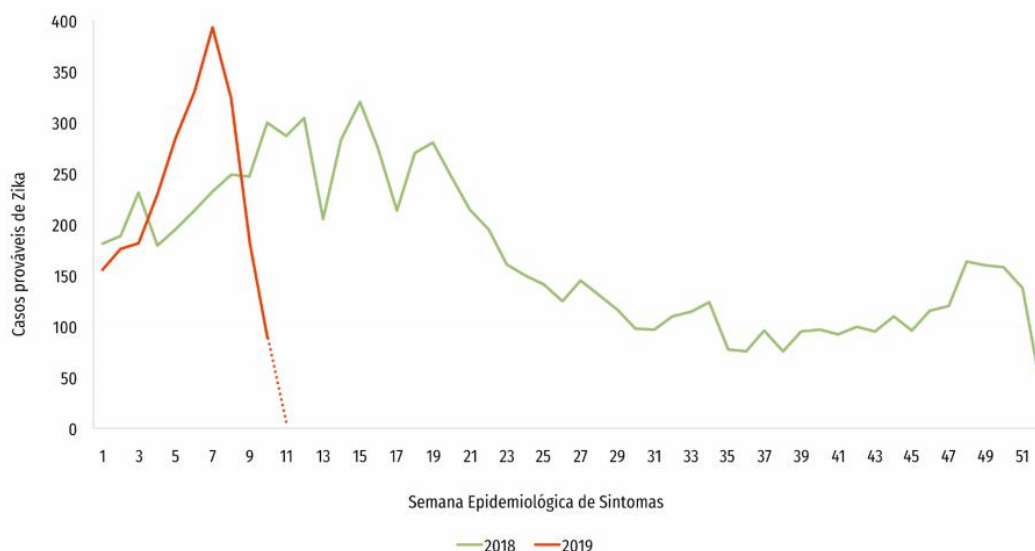
Fonte: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2018.  
<https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/world-map-areas-with-zika>

Em 2018, um estudo demonstrou que a entrada do ZIKV no Brasil se deu através da grande migração, principalmente dos militares brasileiros vindos do Haiti, país sabidamente afetado pela epidemia do ZIKV em 2013. O estudo confirmou que a cepa circulante no Brasil provém de uma cepa viral haitiana sendo introduzido no país de diversas maneiras, o que descarta a hipótese inicial que apontava um paciente como origem da epidemia (CAMPOS et al., 2018). Este fato deixa evidente que o mecanismo de entrada do ZIKV no Brasil, ainda não está bem estabelecido, havendo diversas teorias para tentar elucidar o assunto.

A incidência de ZIKV aumentou rapidamente nas Américas devido a epidemia iniciada no Brasil, considerado o primeiro país entre as Américas onde o vírus foi detectado. Em fevereiro de 2016, a transmissão autóctone foi confirmada em 22 estados brasileiros e o país apresentou uma estimativa de 1.300.000 casos suspeitos até março de 2016 (BOGOCH et al., 2017; ZANLUCA et al., 2015).

No Brasil, até a 11<sup>a</sup> semana epidemiológica (SE) de 2019, foram registrados 2.344 casos prováveis de doença aguda pelo ZIKV, com incidência de 1,1 caso/100 mil habitantes. A região Norte apresentou o maior número de casos su de Zika (39,2%) em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as regiões Sudeste (33,8%), Nordeste (316 casos; 13,5%), Centro-Oeste (10,9%) e Sul (2,6%). Em 2018, até a 34<sup>a</sup> SE, foram registrados 7.071 casos prováveis de doença pelo ZIKV (Figura 2) (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO, 2019).

**Figura 2- Casos prováveis de doença aguda pelo vírus Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2018 e 2019**



Nota: Número de casos prováveis da infecção do ZIKV no Brasil nos anos de 2018 e primeiras semanas de 2019.

Fonte: BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019.

## 2.2 Vírus Zika

O ZIKV é um arbovírus, denominado assim devido a sua transmissão por artrópodes, e principalmente, por ter parte do seu ciclo replicativo no inseto. O vírus pertence, ao gênero *Flavivirus* pertencente à família *Flaviviridae*. Dentre as 53 espécies pertencentes a este gênero estão o DENV, YFV e ZIKV (HAMEL et al., 2015; SIMMONDS et al., 2017).

As informações genéticas ainda são poucas, visto que, intensas pesquisas voltadas para o ZIKV só aconteceram a partir de 2015. Algumas análises filogenéticas nas sequências completas do vírus concluíram que o ZIKV está agrupado em dois principais grupos, que são as linhagens africana e asiática, ambas distintas em tempo e geograficamente (HADDOW et al., 2012; LANCIOTTI et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; WANG et al., 2017).

A partícula do ZIKV é estruturalmente envelopada, icosaédrica, com um diâmetro de aproximadamente 50nm e apresenta um genoma do tipo de RNA não segmentado, linear, de cadeia simples e senso positivo, com 10.807 nucleotídeos de comprimento (Figura 3). O RNA genômico tem uma estrutura cap tipo I na extremidade 5', seguido por uma região 5' não codificante (*Non Coding Region*, NCR) de 107 nucleotídeos e um única sequência aberta de leitura (*Open Reading Frame*, ORF) de

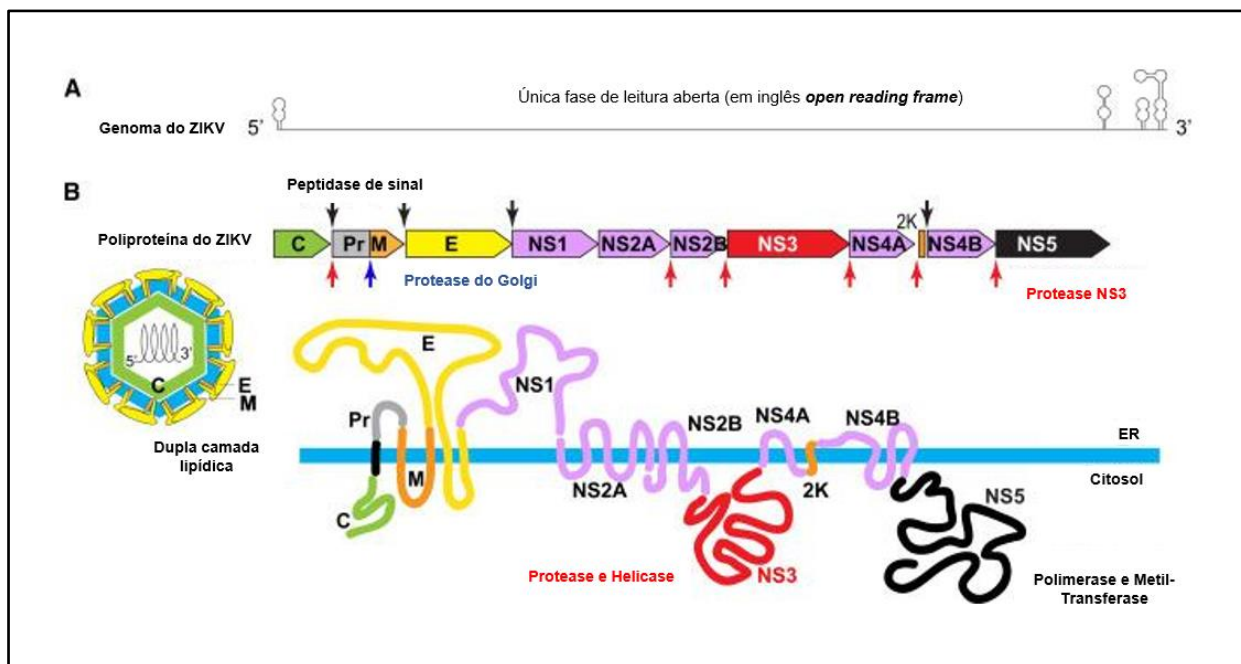


10.272 nucleotídeos. Já a extremidade 3' apresenta uma NCR de 428-429 nucleotídeos, sem cauda Poli-A (KUNO et al., 1998; MARANO et al., 2016; LINDENBACH et al., 2013).

O RNA do ZIKV tem replicação intracitoplasmática e durante a tradução codifica uma polipoproteína com mais de 3.000 aminoácidos. Dentro da partícula viral madura existe a proteína do capsídeo (C)  $\alpha$ -helicoidal, formando um nucleocapsídeo não estruturado complexado com o RNA. O nucleocapsídeo é envolvido por uma bicamada lipídica, derivada do retículo endoplasmático, com duas proteínas de superfície, a precursora de membrana (prM) e o envelope (E). Estas proteínas ficam ancoradas na camada lipídica por meio de domínios transmembranares C-terminal. A partícula viral do Zika contém 180 cópias da proteína E, organizadas em homodímeros antiparalelos com simetria icosaédrica. O monômero da proteína E é formado por 3 partes: um ectodomínio alongado com ligação com o receptor e com atividade de fusão de membrana, uma região central, formada por duas  $\alpha$ -hélices e por fim, uma região transmembrana (ALLISON et al., 1999; STIASNY et al., 1996; ZHANG et al., 2013).

Além dessas proteínas estruturais, o seu genoma também codifica sete proteínas não-estruturais, que são: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (KUNO et al., 1998; LINDENBACH et al., 2007; LINDENBACH et al., 2013; WONG et al., 2016). Alguns estudos que avaliaram a estrutura tridimensional do ZIKV maduro demonstraram que há semelhança deste com outros flavivírus como por exemplo, o DENV e Vírus do Oeste do Nilo (WNV) (MUKHOPADHYAY et al., 2003; ZHANG et al., 2013).

**Figura 3. Estrutura do Vírus Zika e seu genoma**



Legenda: Estrutura do vírus Zika e seu genoma. O ZIKV possui um genoma tipo RNA de fita simples de senso positivo que possui 7 genes que codificam proteínas estruturais do core (C), pré-membrana (M), e do envelope (E) e não estruturais função (NS1), função (NS2A), função NS2B, função NS4A, função (2K), função (NS4B) e as enzimas polimerase e metil-transferase (NS5).

Fonte: Guo-li Ming; Hengli Tang and Hongjun Song, 2016. Adaptado pela autora.

### 2.3 Ciclo de Replicação Viral

Nas células susceptíveis à infecção como, por exemplo, queratinócitos, monócitos, neurônios e células da glia, o processo de replicação viral é semelhante aos outros flavivírus, via endocitose. Para que ocorra esse processo, há um reconhecimento inespecífico por receptores de reconhecimento padrão (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs) que são considerados os responsáveis pelo processo de internalização do vírus. A ligação com esses receptores, provavelmente, antecede a interação específica com a proteína viral E e receptores celulares, até então desconhecidos. Após o reconhecimento, a partícula viral é internalizada via endocitose mediada por clatrina (Figura 4) (HAMEL et al., 2015; YUN; LEE, 2017).

Após a internalização, o envelope é fusionado com a membrana endocítica, havendo a liberação do RNA no interior da célula. A etapa seguinte é a tradução, uma vez que o RNA funciona como o mRNA e direciona a síntese da poliproteína juntamente ao retículo endoplasmático, sendo então traduzido como uma única poliproteína que é processada pelas proteases virais e celulares nas proteínas

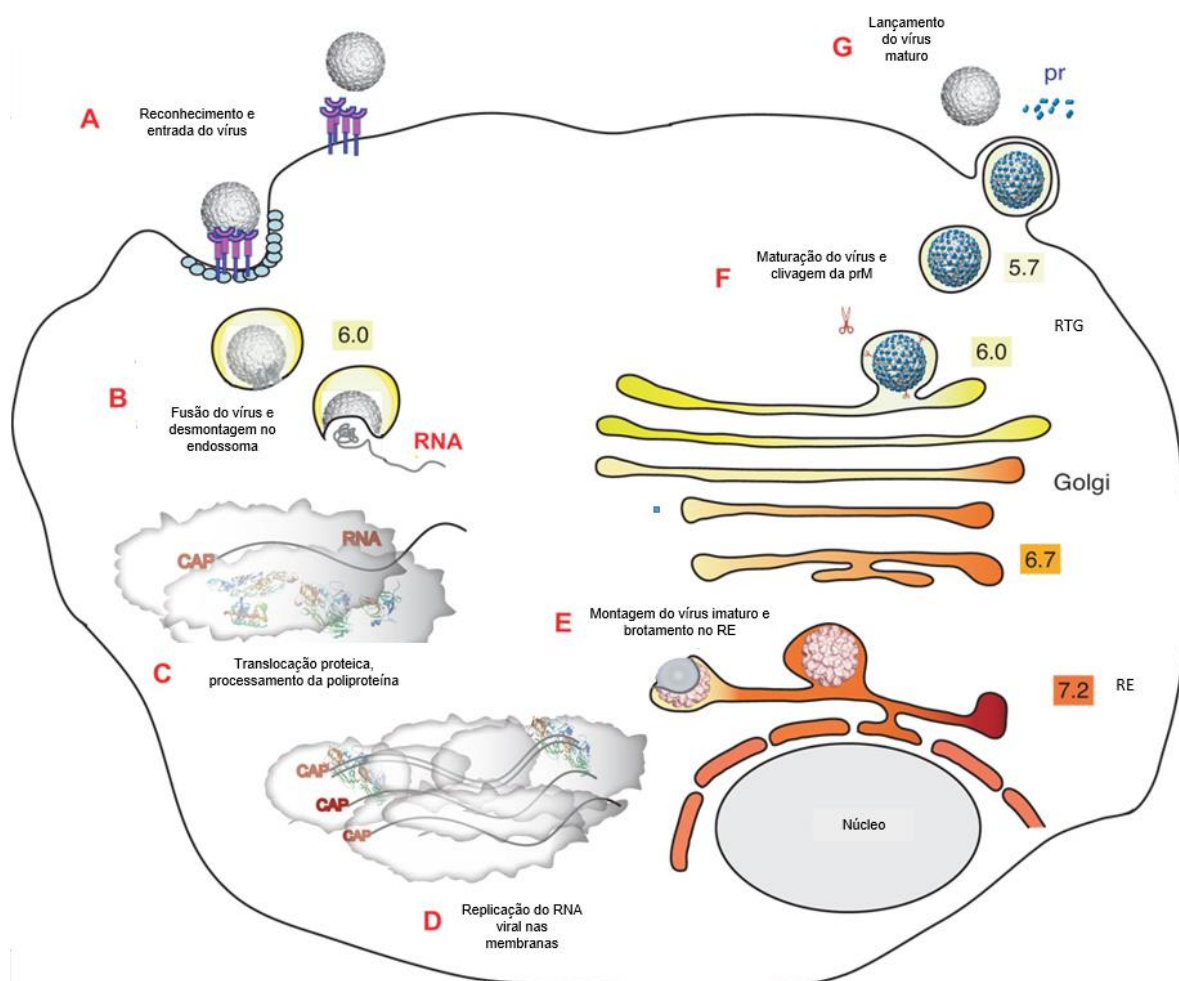
estruturais (C, prM e E) e não estruturais (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B e NS5) (LINDENBACH et al., 2007; LINDENBACH et al., 2013).

Assim, após a tradução das proteínas virais inicia-se a replicação do genoma, no qual o RNA viral é fusionado ao complexo replicativo e a síntese de uma molécula de RNA fita simples polaridade negativa é realizada. O RNA fita simples polaridade negativa serve de molde para a síntese de RNAs fita simples de polaridade positiva. Os novos RNAs de cadeia positiva podem iniciar um ciclo de tradução ou formar novas partículas virais. A interação da proteína C com o RNA genômico do vírus leva a formação do nucleocapsídeo, o qual adquire o envelope viral a partir do brotamento no lúmen do retículo endoplasmático. Alguns estudos demonstram a formação de vesículas citoplasmáticas induzidas pelo ZIKV, como mecanismo de disseminação viral (LINDENBACH; RICE, 2003).

Nos flavivírus, a presença de um cap 5' metilado no sistema do RNA genômico, assim como as proteínas não estruturais são importantes nos processos de tradução, replicação e montagem da partícula viral como também nos mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro (KLEMA; PADMANABHAN; CHOI, 2015; ZÜST et al., 2011; DAFFIS et al., 2010).

Para a formação de novas partículas virais, as proteínas E e prM formam heterodímeros na membrana do retículo endoplasmático e se dirigem para o lúmen do mesmo. Associando-se ao RNA genômico e a proteína C, dando origem aos vírions não infecciosos imaturos. Os vírions irão atingir o complexo de Golgi, seguir a via de secreção celular e sofrer os processos de maturação e serão liberados por exocitose (JUNJHON et al., 2010; PIERSON AND DIAMOND, 2012).

**Figura 4- Ciclo Replicativo dos Flavivírus**



Legenda: A. os vírus se ligam a receptores de reconhecimento localizados na superfície celular e são internalizados. B. as glicoproteínas virais mediam a fusão de membranas virais e celulares, permitindo o desnudamento do virion e a liberação de RNA no citoplasma. C. O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada por proteases virais e celulares. D. Proteínas virais não estruturais replicam o RNA genômico. E. Montagem do vírus no retículo endoplasmático (RE), formação de partículas virais imaturas. F. Partículas virais imaturas são transportadas através da via secretória. Na rede trans-Golgi tem a clivagem mediada por furina de prM impulsionando a maturação do vírus. G. O vírus maduro é liberado. Nota: Os números apresentados na imagem são referentes ao pH dos compartimentos.

Fonte: Rushika Perera, Mansoor Khaliq, and Richard J. Kuhn, 2008.

## 2.4 Manifestações Clínicas

A infecção pelo ZIKV na maioria dos casos é assintomática e apresenta um período de incubação de 10 dias. Quando sintomáticos os pacientes costumam apresentar febre, cefaléia, erupções cutâneas (exantemas) com coceiras, rash maculopapular, artralgia ou conjuntivite não purulenta, com uma duração de até 7 dias. Além disto, algumas alterações laboratoriais também podem ser observadas

neste período, como: leucopenia, trombocitopenia e mudanças nos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (TAPPE et al., 2016; ZANLUCA et al., 2015). Juntamente, a estes sintomas a infecção pelo ZIKV vem sendo relacionada a Síndrome Congênita do Zika (SCZ), caracterizada por um amplo espectro clínico (anormalidades oftalmológicas, calcificação intracraniana, hidrocefalia, e microcefalia, sendo esta última a mais evidente) e a síndrome Guillain-Barré (ANGELETTI et al., 2016; MCCARTHY, 2016; OEHLER et al., 2014).

#### 2.4.1 Microcefalia

Indivíduos que apresentam a cabeça menor do que o tamanho médio na primeira semana de vida, quando comparados com pessoas da mesma faixa etária e sexo (3 desvios padrão abaixo de 30,3 cm para o sexo feminino e 30,7 para o masculino), são considerados portadores de microcefalia. Essa alteração pode ser diagnosticada no período gestacional e é caracterizada pelo crescimento insuficiente do cérebro do bebê que pode ocorrer durante a gravidez, ou após o nascimento. Por ser considerada uma alteração multifatorial, a microcefalia pode estar relacionada a mudanças genéticas, infecções por alguns agentes infecciosos como, vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Toxoplasma gondii*, *Rubella vírus*, citomegalovírus, utilização de drogas e álcool, principalmente no período gestacional (OPAS, 2016).

No final de 2015, após a observação de aumento de casos de microcefalia em alguns estados da região nordeste brasileiro, principalmente em Pernambuco, o Ministério da Saúde declarou situação de emergência. Em novembro deste mesmo ano, foi reportada a presença do RNA do ZIKV no líquido amniótico de grávidas com fetos microcefálicos, demonstrando a relação causal do ZIKV com os novos casos de microcefalia (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2016). Em pouco tempo, o vírus se espalhou pelo país, com consequente aumento da incidência de microcefalia, sendo este considerado o problema mais marcante causado pela infecção (CUGOLA et al., 2016).

#### 2.4.2 Anormalidades Oftalmológicas

Recentemente, a infecção pelo ZIKV vem sendo relacionada com diversas alterações oftalmológicas, como iridociclite hipertensiva, atrofia coriorretiniana, alteração na pigmentação e hipoplasia do nervo óptico. As ocorrências das alterações oftalmológicas são relacionadas com a infecção pelo ZIKV, visto que, os recém-nascidos que apresentaram tais características, foram filhos de mulheres diagnosticadas com a infecção pelo vírus. Os danos oftalmológicos relacionados com o ZIKV ainda necessitam de investigações fisiopatológicas mais detalhadas para que os mecanismos envolvidos no processo sejam compreendidos (FONTES, 2016; VENTURA et al., 2016).

#### 2.4.3 Síndrome de Guillain-Barré

A síndrome Guillain-Barré (SGB) é uma doença autoimune caracterizada por uma polineuropatia parálitica aguda, desmielinizante e de rápida progressão. Os principais sintomas são fraqueza muscular, formigamento, ambulacão instável, podendo chegar a paralisia, além de dor neuropática (ESPOSITO; LONGO, 2017). A causa exata da SGB ainda é desconhecida, mas tem sido associada com infecções respiratórias ou gastrointestinais e mais recentemente, com a infecção do ZIKV (CUGOLA et al., 2016; SCHESSL et al., 2006).

A incidência anual da SGB é de 0,5 podendo chegar a 2 casos por 100.000 habitantes. Essa taxa aumenta à medida que o indivíduo vai amadurecendo, sendo muito rara em crianças com menos de 2 anos. Quanto ao gênero, estudos apontam que os homens são mais afetados do que as mulheres (HUGHES et al., 2016; VAN KONINGSVELD et al., 2000). A diferença da incidência entre as populações pode ser devido a susceptibilidade genética ou a exposição a patógenos como, por exemplo, *Mycoplasma pneumoniae*, *Campylobacter jejuni* e o ZIKV (HO et al., 1995; SAUTEUR et al., 1995).

Os primeiros casos de SGB associados com a infecção do ZIKV aconteceram na Polinésia Francesa em 2013, onde a maior parte dos indivíduos portadores da síndrome também tinham anticorpos contra o ZIKV e apresentaram alterações eletrofisiológicas compatíveis com neuropatia axonal motora aguda (CAO-LORMEAU et al., 2017).

Inicialmente, acreditavam que a SGB era uma desordem relacionada apenas com o dano axonal proveniente da desmielinização. No entanto, atualmente, se sabe da existência de vários fenótipos, dentre eles a polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda e a neuropatia axonal motora aguda (WILLISON, JACOBS, VAN DOORN, 2016).

## 2.5 Transmissão

A transmissão do ZIKV é classificada como vetorial e não-vetorial (IOOS et al., 2014). Desde que o ZIKV foi isolado pela primeira vez, no *Ae. africanus*, muitos outros mosquitos também são apresentados como vetores, por exemplo, *Anopheles coustani*, *Culex perfuscus* e diversas espécies do gênero *Aedes* (ZANLUCA; SANTOS, 2016).

O mecanismo de transmissão vetorial associado ao *Ae. Aegypti* é o mais comum e relevante na área urbana. A fêmea do *Aedes* ao realizar hematofagia, introduz o vírus na pele humana, seguida pela infecção de células permissivas (BRIANT et al., 2014). No entanto, alguns estudos têm confirmado a existência de outras formas de transmissão (BESNARD et al., 2014; MLAKAR et al., 2016; MUSSO, 2015).

As transmissões não vetoriais são consideradas as principais responsáveis pela disseminação da doença em áreas não endêmicas. O ZIKV já foi isolado de diversos fluidos biológicos (urina, saliva, leite materno, fluido amniótico e sangue) possibilitando a disseminação do vírus de pessoa a pessoa por diversas vias (ZANLUCA AND SANTOS, 2016). No sêmen é possível detectar o vírus mesmo após semanas da fase aguda da doença, levando a hipótese de que o ZIKV também pode ser difundido pela transmissão sexual (MUSSO, 2015; OSTER et al., 2016). A transmissão vertical pode acontecer através da via transplacentária, pois o ZIKV é capaz de ultrapassar esta barreira durante o parto e também após na amamentação. (ZANLUCA AND SANTOS, 2016).

## 2.6 Diagnóstico

A realização do diagnóstico da infecção por ZIKV acontece baseado nos sintomas clínicos, prevalência do vetor na região e pela detecção do vírus, antígeno viral, anticorpos e/ou RNA do vírus, por métodos sorológicos e de biologia molecular. É possível realizar o diagnóstico através de diversos tipos de amostras como soro, urina, cordão umbilical, líquido amniótico, saliva, etc. A escolha do método utilizado irá depender da estrutura e do conhecimento laboratorial, mas o tipo de amostra e o tempo de coleta também devem ser considerados (ZANLUCA et al., 2015).

O ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) é utilizado para o diagnóstico sorológico e é capaz de detectar imunoglobulinas do tipo M ou G (IgM ou IgG) contra o ZIKV presente no soro do indivíduo. Para a detecção do RNA viral nas amostras de indivíduos na fase aguda, é realizado uma Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa (RT-PCR). Ainda podem ser realizados outros ensaios como Teste de Neutralização por Redução em Placa (PRNT) ou o isolamento viral para diagnosticar a infecção (CHARREL et al., 2016; LANCIOTTI et al., 2008; TAPPE et al., 2014).

Os testes utilizados para o diagnóstico possuem suas limitações. O maior desafio para o diagnóstico sorológico é a reação cruzada, devido a semelhança entre alguns flavivírus, sendo muito comum em indivíduos com infecção prévia por DENV ou YFV, por exemplo. Porém, em indivíduos que nunca tiveram contato com vírus semelhantes ao ZIKV, o teste apresenta alta sensibilidade. Com o teste molecular esse problema foi descartado, porém apresenta um curto período para detecção do RNA viral, sendo mais indicado coletar as amostras entre o terceiro e quinto dia após o início dos sintomas, devido à alta viremia apresentada neste período. O PRNT e isolamento viral exigem mão de obra especializada e são considerados testes de elevado custo (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016).

A microcefalia é detectada por medição da circunferência occipitofrontal, seguindo os valores predeterminados e levando em consideração a faixa etária e sexo do recém-nascido. O exame de ultrassonografia nas mulheres grávidas pode ser utilizada para a detecção da microcefalia ainda na fase intrauterina do bebê, podendo realizar essa identificação apenas a partir do quinto mês de gestação ou após o nascimento (WHO 2006).



A aplicação de técnicas modernas como PCR multiplex, microarranjos, diagnósticos baseados em nanotecnologia direcionadas para a detecção do ZIKV seria de grande relevância no diagnóstico específico, resultando assim em estratégias para o tratamento do indivíduo e uma prevenção de disseminação do ZIKV eficaz.

## **2.7 Tratamento e Prevenção**

Em caso de infecção pelo ZIKV os sintomas são tratados, mas ainda não há tratamento específico ou vacina para a infecção do ZIKV. O desenvolvimento de vacinas é um processo demorado e a relevância da infecção do ZIKV só tomou grandes proporções em 2015, impossibilitando uma rápida produção da vacina. Vários grupos de pesquisas buscam o desenvolvimento de uma vacina ideal, com uma única dose (que o uso seja seguro para gestantes) e com longa imunidade (SONG et al., 2017)

Além das medicações utilizadas para minimizar os sintomas, medicamentos à base de acetaminofeno e dipirona, também é aconselhado repouso, ingestão de bastante líquido para prevenir desidratação. A administração de aspirina ou outros anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), não é indicada até que a dengue seja descartada, para reduzir o risco de sangramento. Em casos de coceira, anti-histamínicos são indicados (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016).

Para as grávidas é recomendado mais atenção na prevenção de picadas de mosquitos. Em casos de aparecimentos de sintomas deve ser realizado uma anamnese criteriosa e o diagnóstico laboratorial ser realizado no pré-natal, assim como avaliações para detectar anormalidades cerebrais (ZANLUCA; SANTOS, 2016).

Para que se tenha a administração de um tratamento específico é necessário um melhor entendimento dos mecanismos imunológicos, da caracterização molecular e a imunopatogênese envolvida na infecção do ZIKV. O controle e as medidas preventivas relacionadas a infecção do ZIKV, constituem, principalmente, o combate da proliferação da população de mosquitos vetores, através de estratégias mecânicas, químicas e biológicas. Esse combate é de extrema importância, e uma vez que, os mosquitos além de transmitirem o ZIKV, também estão associados a transmissão do DENV e CHIKV (AHMAD; AMIN AND USTIANOWSKI, A 2016).

Por meio de remoção de objetos, que são potenciais locais de reprodução dos mosquitos, temos as estratégias mecânicas de prevenção. O acondicionamento correto da água e a retirada de objetos que podem servir como reservatórios são medidas simples que evitam a proliferação do mosquito e conseqüentemente as arboviroses em evidência atualmente no país (ARAÚJO et al., 2015).

Os mecanismos químicos utilizados para a prevenção da reprodução dos mosquitos já são considerados uma técnica ultrapassada, no entanto, atualmente o diferencial é a busca da minimização dos efeitos tóxicos atrelados a eles. A utilização de produtos químicos como piretróides, organocloreto e organofosforado são comuns para evitar os mosquitos, visto que, afetam o sistema nervoso dos vetores. No entanto, os insetos estão desenvolvendo resistência a muitos desses produtos, tornando uma desvantagem desse mecanismo. Como alternativa para essa desvantagem, produtos fitoterápicos vêm sendo utilizados como agente antimicrobiano e no controle de vetores. Os extratos de plantas são utilizados como inseticidas e também como repelentes, como por exemplo a Citronela, um potente repelente que pode ser usado diariamente, sem causar danos (GHOSH; CHOWDHURY; CHANDRA, 2012; MONTROYA et al., 2012).

As medidas de controle vetorial biológica envolve o uso de uma bactéria chamada, *Bacillus thuringiensis israelenses*, o fungo *Beauveria bassiana* e peixes que se alimentam de larvas. Algumas técnicas que envolvem esterilização dos mosquitos machos, modificações genéticas vêm sendo utilizadas com o objetivo de atuar diretamente na reprodução dos vetores para minimizar a disseminação do vetor (BOYCE et al., 2013; DARBRO et al., 2012; KANT et al., 2013).

## 2.8 Imunidade inata e ZIKV

A imunidade inata é considerada a primeira barreira de defesa contra patógenos, recebe esse nome por estar presente desde nascimento e representa uma resposta sistêmica importante na prevenção do estabelecimento de infecções e na manutenção da homeostase. É constituída por barreiras epiteliais, células circulantes e teciduais e proteínas plasmáticas (lectina ligadora de manose, proteína c reativa, proteínas do sistema complemento). As células efetoras com maior relevância da imunidade inata são os neutrófilos, células *natural killer* (NK) e os fagócitos mononucleares, essas células são capazes de atacar os microorganismos que

ultrapassaram as barreiras epiteliais e entram na circulação ou no tecido para defender o organismo invadido (ABBAS A.; LITCHMAN, A; PILLAI, S, 2008).

A primeira linha de defesa da imunidade inata é a pele. Composta por derme e epiderme, as células dessas camadas são possivelmente as primeiras a serem infectadas pelo ZIKV na infecção vetorial (ABBAS A.; LITCHMAN, A; PILLAI, S, 2008; HAMEL et al., 2015). Os queratinócitos expressam receptores DC-SIGN e TAM (AXL,Tyro3), que estão amplamente envolvidos na entrada de alguns flavivírus, aumentando a credibilidade da hipótese que são as primeiras células a serem infectadas (HAMEL et al., 2015; MINER et al., 2016). Além da participação desses receptores, outros mecanismos da imunidade tanto inata como adaptativa também estão envolvidos na resposta a infecção viral. No entanto, de uma maneira geral, as respostas imunológicas às infecções virais são mediadas pela via de sinalização de interferons (IFN).

Essa via tem início com o reconhecimento do material genético das partículas virais pelos TLRs, o que desencadeia uma resposta imune para controlar a replicação viral. A ligação dos receptores celulares com as partículas virais resulta na ativação de uma cascata de sinalização que estimulará a produção de IFN e algumas citocinas pró inflamatórias e dessa maneira tentar conter a replicação do vírus (WU et al., 2017).

A ativação da via do IFN-I em células epiteliais infectadas com ZIKV já foi comprovada em estudo realizado por Frumence et al., 2016, onde foi observado um aumento na transcrição do gene do IFN- $\beta$  a partir das 12 horas pós infecção (hpi) e atingiu um pico máximo nas 48 hpi. O IFN-I tem a capacidade de inibir a replicação do ZIKV em células epiteliais humanas, tanto quando tratados antes da infecção, quanto após a infecção. Uma vez estabelecida, a reversão do quadro infeccioso se torna mais difícil. Um estudo demonstrou esse mesmo resultado quando realizada uma avaliação *in vivo* da interferência na taxa de replicação em camundongos deficientes de IFN-I, quando comparados a camundongos selvagens (LAZEAR et al., 2017).

A via de sinalização do IFN consiste no reconhecimento do genoma viral através dos TLRs que são expressos na superfície e nos endossomos das células, e por receptores citosólicos RIG-1 e MDA-5, que resulta na expressão de genes pró-inflamatórios e genes do IFN-I, os quais são dependentes dos ator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e Fator Regulador do Interferon 3 (IRF-3). Os vírus de RNA fita simples, como o ZIKV, por exemplo, são reconhecidos pelos TLRs 3, 7 e 8

endossomais. O IFN-I ao interagir com os receptores de IFN-I (IFNAR1) expressos na superfície celular (ação autócrina e parácrina) dá início a via de indução do IFN-I, que leva a ativação da via de Tirosinas Quinases de Janus (JAK) e os Ativadores da Transdução de Sinal da Transcrição (STAT) (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription, JAK/STAT) essencial para a transcrição de mais de 300 genes estimulados por IFN (ISGs). Estes genes, por sua vez, irão sintetizar proteínas que induzem o estado antiviral e eliminam a infecção (LINDENBACH et al., 2013; KUMAR et al., 2016).

Estudos demonstram o delineamento do perfil imunológico em indivíduos infectados com ZIKV. Foi notado que na fase aguda há um aumento significativo nas concentrações séricas das moléculas como CCL5/RANTES, algumas interleucinas, como por exemplo: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17 e TNF, enquanto que, na fase de convalescença esse perfil se modifica apresentando aumento de CXCL10/IP-10 e IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-13 como moléculas imunorreguladoras (ORNELAS et al., 2017; QUICKE et al., 2016; TAPPE et al., 2016).

Ainda se tratando de perfil imunológico, dessa vez, do líquido amniótico em grávidas com fetos com microcefalia, uma avaliação foi realizada, demonstrou que quando comparado com líquido amniótico de grávidas sem fetos com microcefalia há um aumento significativo das seguintes citocinas inflamatórias: IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-9, IL-15, IFN- $\gamma$ , TNF. As quimiocinas mais presentes foram: IL-8, IP-10, MCP-1 MIP-1  $\beta$  e moléculas de adesão: G-CSF, IL-7, GM-CSF (ORNELAS et al., 2017).

Estudos com monócitos, apresentam essas células como cruciais no processo de indução de resposta imune na infecção pelo ZIKV. São os principais alvos do ZIKV, são capazes de regular a replicação dos vírus pela produção de IFN- $\alpha$ , de ativar a via do inflamassoma, liberar citocinas. Para a definição do perfil imunológico induzido pela infecção do ZIKV são necessários muitos estudos, no entanto, a importância da participação dos monócitos é bem estabelecida (FOO et al., 2017; KHAIBOULLINA et al., 2017).

### 2.8.1 Via de sinalização do INTERFERON

Os interferons são glicoproteínas sintetizadas e liberadas por células hospedeiras em resposta a uma invasão de bactérias, vírus, parasitas ou até mesmo algum tumor. Foram assim chamadas, devido a sua capacidade de “interferir” no processo de replicação viral em células hospedeiras. São divididos em 3 tipos e cada tipo é subdividido em classes, são os IFN tipo I, que inclui os IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , e IFN- $\omega$ , o IFN do tipo II, que inclui apenas o IFN- $\gamma$  e o tipo III, composto pelos IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 e IFN- $\lambda$ 3. A *Human Genome Organization Gene* (HUGO), em 2012, alterou os símbolos oficiais dos genes IL-29, IL-28A e IL-28B para IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 e IFN- $\lambda$ 3 devido ao fato que essas citocinas funcionam, principalmente, como IFNs (STARK et al., 1998; PESTKA et al 1987;KOTENKO et al 2011). Os IFNs são responsáveis pela indução de diversos genes capazes de mediar múltiplas respostas biológicas, dentre elas, a resposta imune contra vírus (GALANI et al., 2017).

Dentre os IFNs tipo I, o IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  são os principais. Ambos são produzidos por, praticamente, todas as células do corpo em resposta à infecções virais. A sinalização se dá através de um receptor heterodimérico chamado de receptor do interferon *alpha* (IFNAR), que é expresso em muitos tecidos, e é composto por 2 subunidades denominadas IFNAR1 e IFNAR2. Uma vez que esse receptor é ativado, uma cascata de sinalização ocorre, resultando na transcrição de muitos Genes Estimulados por IFN (do inglês, *IFN-stimulated genes*, ISG). Constitutivamente, a subunidade IFNAR1 está associada à tirosina kinase 2 (Tyk2) e à IFNAR2 ao JAK1, que são fosforilados na ativação do receptor (Figura 5). O IFNAR2 tem um pequeno papel na ligação do IFN aos receptores, no entanto, é importante para a indução da sinalização do IFN. O IFNAR 1 é expresso na membrana de células T, B e células mielóides e o IFNAR2 é altamente expresso nas células mielóides (BERNABEI et al., 2001; COLAMONICISG et al., 1994; GALANI et al., 2017).

Os IFNs tipo I ativam STAT1, STAT2, STAT3 e STAT5. As STAT1 e STAT2 quando fosforilados formam dímeros que se associam com o Fator Regulador de Interferon 9 (IRF9), formando um complexo, chamado de Gene do Fator 3 Estimulado por IFN (ISGF3, do inglês, *IFN-stimulated gene factor 3*) que é translocado para o núcleo (HERVAS-STUBBS et al., 2011; STARK; DARNELL, 2012). O complexo é então ligado aos Elementos de Resposta Estimulados por IFN (IRES, do inglês, *Interferon-Stimulated Response Elements*), induzindo a transcrição do gene. O ISGF3

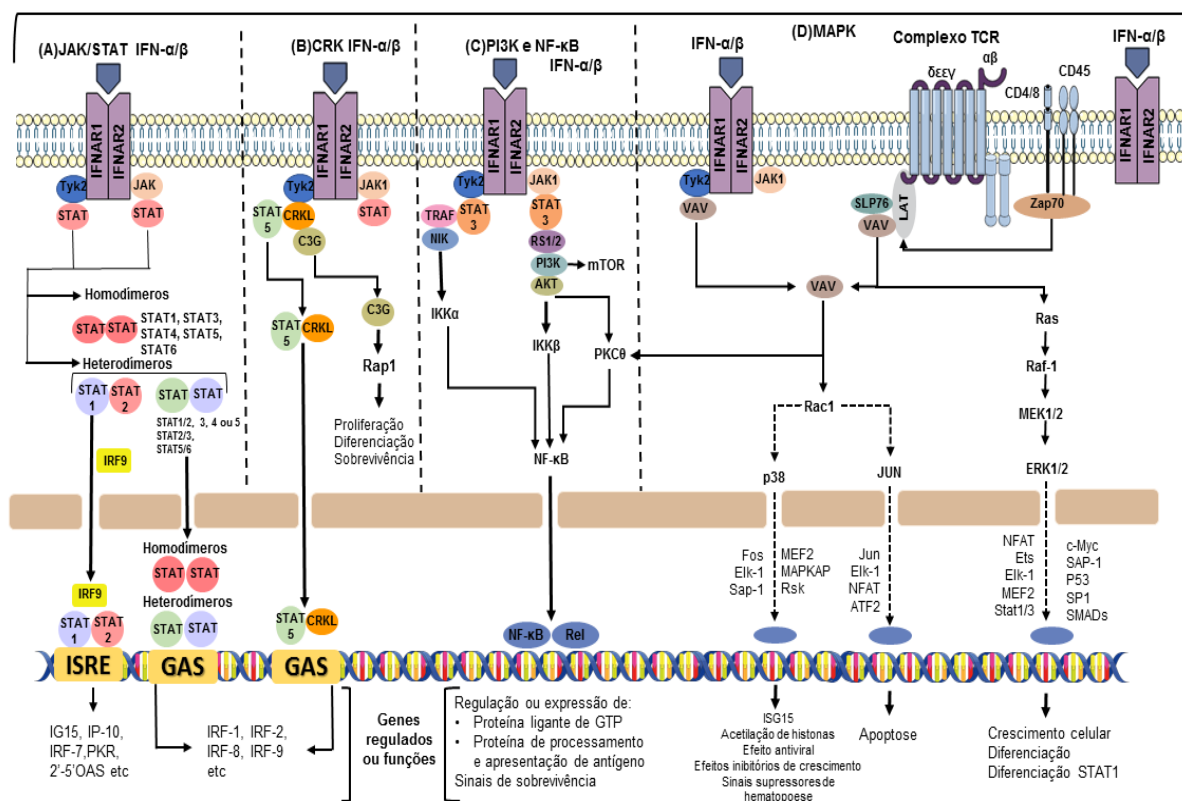
não é o único complexo formado, vários outros complexos induzidos pelo IFN são formados, envolvendo tanto homodímeros como heterodímeros de STAT1, STAT3 e STAT5 (STARK; DARNELL, 2012; UDDIN et al., 1999).

As STATs podem apresentar perfis biológicos opostos, por exemplo, a STAT1 inibe crescimento celular, enquanto que a STAT3 estimula. Para a produção de IFN- $\gamma$  é preciso uma ativação mediada por STAT4, enquanto que o STAT 1 regula negativamente esse processo (NGUYEN et al., 2000).

A estimulação da via IFNAR/JAK/STAT1 pode ser responsável pela regulação de receptores TAM (principalmente, Axl) que ficam acumulados na superfície celular, se ligando fisicamente ao IFNAR, utilizando a via IFNAR/STAT1 e estimulando a transcrição de supressores de citocinas. As proteínas supressoras interrompem a sinalização do IFN tipo I, podendo interagir diretamente no bloqueio das atividades catalíticas das JAKs ou até mesmo sua ligação ao receptor (HERVAS-STUBBS et al., 2011).

Várias cascatas de sinalização são capazes de gerar respostas aos IFN-I, como a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e a cascata clássica ou alternativa NF- $\kappa$ B. Essas vias podem ser ativadas de forma dependente ou independente do JAK-STAT, no entanto, as vias MAPK, PI3K e NF- $\kappa$ B a ativação do receptor dependente de tirosina, sugere, que possivelmente pode acontecer um “*cross talk*” entre os IFNAR e outros receptores das células imunológicas (HERVAS-STUBBS et al., 2011).

Figura 5: Vias de sinalização dos IFNs tipo I



Legenda: Esquema das vias de sinalização do IFN, enfatizando o “crosstalk” com diferentes cascatas de sinalização, que dependem da identidade e do status de ativação da célula que responde ao IFN-I. A) Via de sinalização JAK/STAT B) Via CRK. C) Via de sinalização de PI3K e NF- $\kappa$ B. D) Via de Sinalização MAPK

Fonte: Hervas-Stubbs et al 2011. Adaptado pela autora.

Os IFN-I são capazes de inibir diretamente a proliferação de células infectadas por vírus e aumentando a expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*, MHC) de classe I e dessa maneira aumentando o reconhecimento antigênico. Além do mais, possui efeito direto nas células imunológicas pela ativação do IFNAR e indiretamente pela estimulação de células importantes na ativação da resposta imune, como as células dendríticas, pela indução das quimiocinas e pela secreção das citocinas (WU et al., 2017).

### 2.8.2 Via de Sinalização JAK/STAT

As Tirosinas Quinases de Janus (JAK) e os Ativadores da Transdução de Sinal da Transcrição (STATs) são consideradas como famílias de proteínas quinases e podem ativar diferentes membros para resultar em diferentes efeitos na célula. A Via

JAK/STATs é considerada uma das principais classes de vias de sinalização que usam receptores de superfície celular para dirigir a transcrição gênica e desenvolvimento do organismo (BANERJEE et al., 2017; DURHAM et al., 2019). Essa cascata de sinalização é iniciada através da ligação de citocinas em seu receptor, causando a mudança conformacional que resulta na ativação dos associados de JAK, gerando um local de ancoragem para as STATs, que também são fosforiladas e se dimerizam. As STATs são consideradas fatores de transcrição importantes para a ativação genética das citocinas (MULLER, 2019).

As JAKs são formadas por quatro domínios estruturais contendo sete regiões homólogas, denominadas de JH1- JH7. O JH1 e JH2 exibem domínios quinase e pseudoquinase, o JH1 apresenta um alto grau de homologia entre as tirosinas quinases, enquanto que JH2 é considerada uma pseudoquinase, demonstrando uma atividade mais de regulação do que catalítica. JH3 e JH4 tem como principal função proporcionar estabilidade estrutural da proteína. JH5, JH6 e JH7 são domínios cruciais na associação da JAK aos receptores de mesma origem. As JAKs estão associadas com diferentes tipos de IFNs, tendo funções primordiais nos mecanismos biológicos induzidos por essa proteína, inclusive na imunidade antiviral (BABON; LIAU; KERSHAW, 2016).

Quanto as STATs, existem sete membros na família, as STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, e STAT6, que são apontadas como ativadores transcricionais e apresentam a sua ativação dependente da fosforilação da JAK, que por sua vez, fosforila tirosinas específicas. Dessa maneira as STATs (já fosforiladas) translocam para o núcleo e direcionam a resposta biológica adequada (FISH; PLATANIAS, 2014; ABBAS A.; LITCHMAN, A; PILLAI, S, 2008). As STATs são capazes de atuar como homodímeros, heterodímeros e até mesmo como tetrâmeros, podendo ser fosforiladas por proteínas quinases, como a piruvato quinase. Cada membro das STATs pode ser ativado por várias citocinas e pelos associados de JAK, podendo transmitir sinais específicos, de acordo com o perfil das moléculas estimulatórias. Após sofrer a fosforilação de tirosina por Jaks e a translocação para o núcleo, as STATs podem então regular a transcrição dos ISGs por ligação a elementos promotores específicos. Por fim, as STATs nucleares são desativadas pela desfosforilação (O'SHEA et al., 2015).



### 2.8.3 Via das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno (MAPK)

As proteínas quinases são capazes de se ligar covalentemente ao fosfato da cadeia lateral de treonina, serina e tirosina de proteínas intracelulares específicas. As Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno (MAPK, do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Figura 6) compõem uma família de serina/treonina quinases, que são ativadas por fosforilação em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares. As vias de sinalização MAPKs são evolutivamente conservadas em eucariotos, induzem fosforilações e ativações de numerosas proteínas intracelulares, o que contribui para a transdução de sinais envolvidos em processos celulares de proliferação, diferenciação, resposta a estresse e a apoptose (RUBINFELD; SEGER, 2005; SUN et al., 2015).

A via MAPK é considerada uma via chave no controle da sinalização de citocinas, sendo assim, uma via extremamente importante na regulação da resposta imune inata. Esta via é composta por três famílias de sinalização, bem caracterizadas, de acordo com a semelhança no nível da sequência primária de aminoácidos e o modo de ativação. As subfamílias são: ERK1 e ERK2 (do inglês, *extracellular-signal-regulated kinase*); JNK (do inglês, *c-Jun amino-terminal kinase*), p38MAPK. Mais tardiamente foi descoberta a subfamília ERK 5 (FISH; PLATANIAS, 2014).

A subfamília ERK1 e ERK2 está envolvida com processos de divisão e diferenciação celular, podendo ser ativada por fatores de crescimento, hormônios, infecção viral e citocinas. É composta por diversos fatores entre eles, MKKK (do inglês, *MAPK kinase kinases*), B-Raf, A-Raf que podem ser ativados por Ras, um proto-oncogene (CUADRADO; NEBREDÁ 2010).

A subfamília JNK é caracterizada como proteínas quinases ativadas por estresse celular, portanto, diversos fatores podem ser responsáveis por induzir a resposta dessa via, como por exemplo, radiação, espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *Reactive Oxygen Species*), choque térmico e lipopolissacarídeo (LPS). O processo de regulação dessa subfamília também é influenciado pela MKKK e sua ativação pode resultar no controle da apoptose (GALANI et al., 2017).

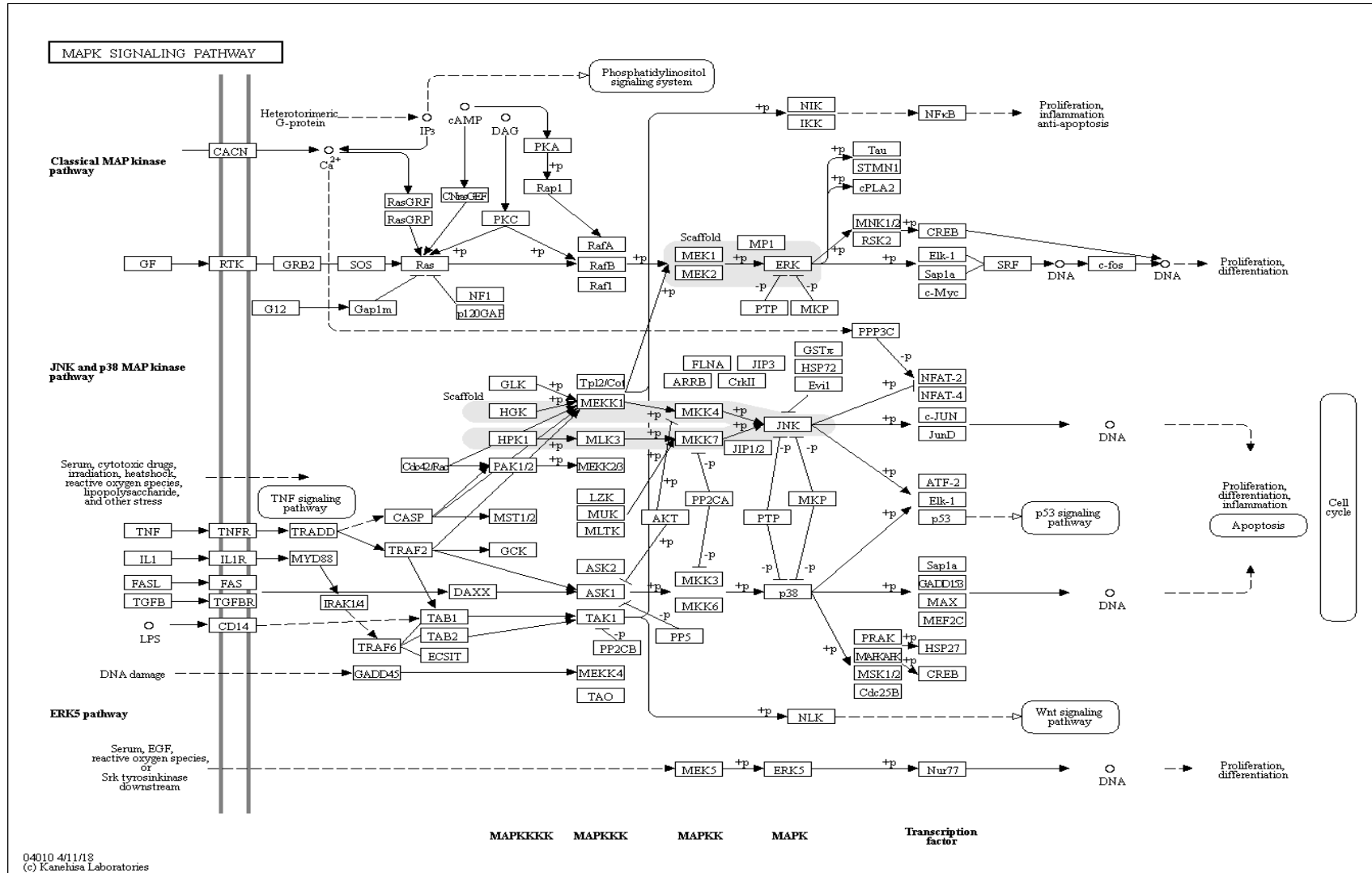
A via p38MAPK é composta pelas quinases:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ , sendo a " $\alpha$ " a mais bem caracterizada e expressa em diversos tipos celulares. Assim como a subfamília JNK, a p38MAPK, pode ser ativada por fatores relacionados ao estresse celular e mais

comumente nas células imunes é ativada por citocinas inflamatórias e possui um importante papel na ativação da resposta imunológica. Outra via da MAPK é a ERK5 (também conhecida como *big MAPK*, BMK1), porém mecanismos envolvendo essa via ainda precisam ser mais discutidos. MEK5 ativa ERK5 por fosforilação, semelhante ao que acontece com ERK1/2, no entanto, ERK5 não pode ser fosforilado por MEK1/2, e MEK5 não pode fosforilar ERK1/2 (SUN et al., 2015).

As diferentes MAPKs são responsáveis pela ativação de diferentes processos biológicos. Por exemplo, as funções da p38MAPK são essenciais para as propriedades antivirais dos IFNs-I. Além disso, a cascata ERK ativada pelo IFN-I é capaz de regular o crescimento, diferenciação e fosforilação de serina a nível celular (FISH; PLATANIAS, 2014).

No entanto, o conhecimento a respeito da ativação dessas diversas vias de sinalização no contexto da infecção pelo ZIKV ainda não está totalmente esclarecido. Alguns estudos já apresentam a participação das vias de MAPK na sinalização da imunidade inata na infecção pelo ZIKV (KHAIBOULLINA et al., 2017; RAJ et al., 2019). Como por exemplo, p38MAPK, ERK e NF- $\kappa$ B tem participação importante na indução da resposta inflamatória decorrente da infecção do ZIKV em células de retina. Entretanto, a ativação dessa via no contexto da infecção viral em células monocíticas ainda não é bem estabelecido.

Figura 5: Via de Sinalização MAPK



Legenda: Vias de sinalização da MAPK. Fonte: Kegg Pathway

## 2.9 Células permissivas a infecção do ZIKV

Os conceitos sobre susceptibilidade e permissividade à infecção de um vírus é bem estabelecido na virologia clássica, em que células consideradas susceptíveis são aquelas que possuem a capacidade de serem infectadas, enquanto que, células permissivas correspondem aquelas que permitem a replicação viral e geração de uma nova progênie. Nesse contexto, as células relevantes como alvo de estudos são as que no processo de infecção apresentam estas características (LINDENBACH, et al 2013). No entanto, após a descoberta da importância médica do ZIKV, a permissividade e a susceptibilidade de muitas células foram questionadas. Desde então, estudos avaliam essas características em células de linhagem ou células primárias. Muitos desses estudos levam em consideração a experiência com os processos já estudados com DENV devido à sua semelhança com o ZIKV.

Assim como foi realizado com o DENV e devido a capacidade da inoculação do ZIKV pela picada do mosquito, se avaliou células da pele humana como alvos potenciais de infecção e replicação do ZIKV, comprovando assim que os fibroblastos primários humanos e queratinócitos primários humanos são alvos da infecção com o vírus (HAMEL et al., 2015).

As células placentárias e células do sistema nervoso central também são alvo de estudos devido ao perfil dos sintomas decorrentes da infecção do ZIKV. Um estudo realizado por Simoni et al., (2017) demonstrou que o ZIKV é capaz de infectar e se replicar em células da placenta, independente da cepa, seja africana ou asiática. Quanto a células do sistema imune, os monócitos se mostraram suscetíveis e permissivos ao ZIKV, além de serem considerados os principais alvos da infecção no sangue periférico. Foi demonstrado também que o processo de infecção de monócitos (CD14+) desencadeia a ativação de células da resposta imune inata como células NK (LUM et al., 2018).

Alguns trabalhos apresentam o DENV com um intenso potencial de infecção nas células da pele, células fagocíticas, como por exemplo, macrófagos, células dendríticas, além de ser capaz também de infectar células de linhagem, como, K562 que é uma célula humana de eritroleucemia, U937 que é uma célula de leucemia promonocítica humana e THP-1 que é uma célula de leucemia monocítica humana (KYLE; BEATTY; HARRIS, 2007; PUERTA-GUARDO et al., 2013; DAPAT; PASCAPURNAMA; IWASAKI, 2017; WU et al., 2017).

As células de linhagem são bastante utilizadas para pesquisa, devido a sua capacidade de serem mantidas em cultura por muito tempo, característica que permite sucessivas passagens e procedimentos para estudos como, por exemplo, infecções virais e diferenciação celular. Tais características fazem destas linhagens ferramentas importantes para o desenvolvimento de trabalhos *in vitro*, além de permitir o desenvolvimento de estudos de triagem que precedem análises *in vivo*, como o estudo de novos alvos farmacológicos. As células de linhagem U937 e THP-1 são utilizadas para estudos que envolvam mecanismos imunológicos, visto que, são células consideradas pró-monocíticas e monocíticas (CHANPUT; MES; WICHERS, 2014; PENG et al., 2016).

As células THP-1 são células de linhagem derivadas do sangue de um paciente com leucemia monocítica aguda, a qual foi estabelecida e caracterizada por Tsuchiya *et al.*, (1980). São morfológicamente semelhantes a monócitos primários e macrófago quanto ao processo de diferenciação. Essas células exibem um aspecto morfológico unicelular arredondado e expressam marcadores diferentes dos monócitos. Quando comparadas com monócitos primários, as THP-1 apresentam algumas vantagens como a de ter um *background* genético homogêneo e uma modificação genética por RNA de interferência relativamente simples.

Visando estudar as funções e os mecanismos dos monócitos/ macrófagos, as THP-1 tem sido uma célula de linhagem amplamente utilizada, além de serem usadas nos estudos de transporte de nutrientes e drogas e de vias de sinalização celular (CHANPUT; MES; WICHERS, 2014).

### 3 JUSTIFICATIVA

O ZIKV demonstrou, nos últimos anos, um relevante potencial de iniciar epidemias. Até pouco tempo, este vírus não estava em evidência devido a limitada capacidade de infecção em humanos, que quando existentes causavam prejuízos irrisórios. Devido à grande quantidade de casos de infecção pelo ZIKV confirmados em vários países do mundo e da sua relação com distúrbios neurológicos, ficou evidente a importância de se estudar os mecanismos envolvidos na infecção desse vírus. No entanto, as vias de sinalização envolvidas na resposta imune contra o ZIKV ainda não estão bem elucidadas.

Dessa maneira, estudos que visam uma melhor compreensão dos mecanismos imunopatogênicos da infecção pelo ZIKV tornam-se extremamente necessários, podendo levar à descoberta de novos alvos terapêuticos ou formas de controlar a infecção. Vias associadas com a proliferação, migração, diferenciação, envelhecimento celular e apoptose, como a via de sinalização JAK/STAT e a via MAPK podem sofrer influência da infecção do ZIKV e serem importantes mediadores da morte das células infectadas pelo ZIKV. Os monócitos são células de defesa e são consideradas as primeiras a serem infectadas pelo ZIKV, e por isso células monócíticas, como THP-1, podem ser usadas como modelo de estudo. O principal objetivo deste trabalho é contribuir para os estudos imunopatogênicos *in vitro*, nos quais as alterações de vias metabólicas específicas em células da imunidade inata infectadas experimentalmente com ZIKV serão estudadas.

Diante da emergência causada pelos sérios impactos na saúde pública e socioeconômico acarretado por um vírus quase desconhecido, se faz necessário o desenvolvimento de estudos que nos permitam compreender melhor sobre os aspectos relacionados a biologia viral, a citopatologia, a interação vírus-hospedeiro, as formas de detecção e de tratamento da infecção, a fim de preencher lacunas que dificultam a descoberta de novos alvos terapêuticos ou possíveis maneiras de controlar ou minimizar os danos da infecção.

## 4 OBJETIVO GERAL

Traçar o perfil imunológico na linhagem humana de células monocíticas THP-1 infectada pelo ZIKV.

### 4.1 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar a infecção do ZIKV nas células de linhagem monocítica humana (THP-1);
- b) Avaliar a expressão gênica da Via das Proteínas quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases Pathway*) no contexto experimental estudado;
- c) Analisar o perfil de citocinas/quimiocinas pro-inflamatórias produzido por células THP-1 frente à infecção por ZIKV.

## 5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O projeto foi realizado no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE) e no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz -FIOCRUZ-PE.

### 5.1 Descrição do local de experimentação

Todos os procedimentos operacionais padrão usados no IAM seguem os regulamentos de biossegurança descritos no Plano Quadrienal da FIOCRUZ 2005/2008, e ISSO 17025, além de conter todos os equipamentos requeridos para nível de segurança 2, de acordo com a Lei 11.105/2005 da CTNBio.

### 5.2 Cultivo de células VERO

As células Vero (ATCC® CCL81™) são células de linhagem epitelial, originada do rim de macaco verde africano adulto (*Cercopithecus aethiops*). Para seu cultivo são mantidas em meio *Minimum Essential Medium* (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico/antimicótico, estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Essas células foram utilizadas para a produção do estoque viral e os ensaios de placas realizados no presente estudo.

### 5.3 Produção de Estoque Viral

Para a produção do estoque viral foram utilizadas células Vero (ATCC® CCL81™) e cepa asiática ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/2015 isolada de paciente. Cada cultura de células Vero foi inoculada com ZIKV, em garrafas ventiladas de 75cm<sup>2</sup>, contendo uma confluência de 80%, em meio MEM com 2% de SFB, suplementado com bicarbonato de sódio 5%, 1% de antibiótico/antimicótico. O cultivo foi mantido por 6 dias, em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Após esse período, o sobrenadante foi recolhido, aliquotado em criotubos e armazenado a -80°C. Posteriormente, foram titulados por ensaio de placas.



## 5.4 Titulação Viral

Os estoques de vírus foram titulados através de ensaio de placas. Para tal,  $1,0 \times 10^5$  células Vero foram distribuídas em cada poço de uma placa de 24 poços, foram infectadas com até 7 diluições seriadas (na proporção vírus: meio - 1:10) dos estoques de ZIKV. Após 1 hora de incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C para a adsorção viral foi adicionado o meio semi-sólido contendo 1% de carboximetilcelulose (CMC) e MEM com 2% de SFB em volume final de 1 ml por poço. Após 6 dias de incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C, o meio semi-sólido foi retirado, as células foram fixadas com formalina e coradas com cristal violeta 3% e o número total de placas foi determinado por contagem a olho nu. Os valores foram expressos em unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml).

## 5.5 Cultivo das células THP-1

As células THP-1 (ATCC® TIB-202) são células de linhagem monocítica humana, que foram utilizadas para análise dos mecanismos celulares do sistema imune frente à infecção pelo ZIKV. As THP-1 foram mantidas em meio RPMI- 1640 suplementado com 10% SFB, 5% de bicarbonato de sódio, 1% de piruvato de sódio, 2- mercaptoetanol e 1% de HEPES. As células foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C, até a realização dos experimentos.

## 5.6 Infecção das células THP-1

As infecções das células THP-1 foram efetuadas com diferentes desenhos experimentais, havendo diferença nas multiplicidades de infecção (*Multiplicity Of Infection-MOI*) e intervalos de coletas das amostras celulares. Em dois dos ensaios de caracterização da infecção do ZIKV em THP-1 (RT-qPCR e marcação por anexina-7AAD) foram usadas infecções diferentes MOI de 0,1; 1,0 e 5,0, afim de observar a produção de carga viral das células frente a exposição de diversas concentrações de partículas virais. Com exceção desses experimentos, todos os outros foram realizados utilizando a MOI de 5,0. As incubações para a inoculação viral foram feitas em tubos do tipo “falcon”, mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C durante o período de um hora. Após esse período, o inóculo viral foi retirado, as células foram

ressuspendidas em meio RPMI-1640 a 2% SFB. As etapas seguintes dependeram do desenho de cada experimento.

### **5.7 Ensaio de Placa**

Com a finalidade de observar o efeito citopático das partículas virais resultantes da infecção das células THP-1, um milhão de células foram infectadas com a MOI de 5 com intervalos de 12 horas, iniciando em 12hpi e finalizando em 96 hpi. Os sobrenadantes foram coletados das células infectadas e não infectadas e armazenados em freezer -80°C para posterior realização do ensaio de placa. Após o intervalo de 48 horas do plaqueamento de  $1,0 \times 10^5$  células vero em placa de 24 poços, foi realizado o ensaio de placa com os sobrenadantes das culturas de células THP-1. Duzentos microlitros dos sobrenadantes de 12, 24, 48, 72 e 96 horas pós infecção foram adicionados a placa de 24 poços e incubados por 1 hora em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Após esse período, meio semi-sólido foi adicionado aos poços e a placa incubada por 6 dias, fixada com formalina e corada com cristal violeta 3%. O efeito citopático causado nas células vero plaqueadas pelas partículas infectantes presentes nos sobrenadantes das culturas de THP-1 foi visualizado a olho nu.

### **5.8 Extração do RNA viral**

O kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Alemanha) foi utilizado para a extração do RNA viral das amostras de sobrenadantes das células infectadas pelo ZIKV, nas condições descritas nos tópicos anteriores. Para tanto, 140µL de amostra foram empregados para extração conforme instruções do fabricante. O RNA foi eluído em um volume final de 60µl e estocado em freezer -80°C para realização dos experimentos subsequentes.

### **5.9 RT-qPCR**

A quantificação da carga viral do sobrenadante da cultura foi realizado por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR), utilizando Kit QIAGEN One Step RT-qPCR (QIAGEN, Alemanha). Após a extração as cópias de RNA viral foram quantificadas, seguindo o

protocolo do fabricante. Foi construída uma curva padrão, por meio de uma diluição seriada originada da extração do RNA viral previamente titulado.

### **5.10 Imunofluorescência**

As células THP-1 foram infectadas pelo ZIKV com um MOI de 5, cultivadas sobre lamínulas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina (1 mg/mL), posteriormente lavadas com PBS e fixadas com solução de paraformaldeído 4%. Em seguida, foram realizados o bloqueio e permeabilização das células com solução 3% BSA e 0,5% Triton durante 10 minutos à temperatura ambiente, respectivamente. O anticorpo primário anti-4G2 foi adicionado e incubado em câmara úmida a 37°C durante 1 hora. Após 3 lavagens com PBS, foi adicionado o anticorpo secundário anti-coelho conjugado AlexaFluor 488 (Thermo Fisher Scientific) na diluição 1:10.000, diluído em PBS e incubado em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS e montadas em lâminas utilizando-se o meio de montagem para fluorescência ProLong® Gold com DAPI (Life Technologies). As lâminas foram então analisadas por escaneamento em microscópio Leica DFC300 FX® utilizando a objetiva de 100x de imersão em óleo.

### **5.11 Marcação AnexinaV/ 7AAD**

As células THP-1 foram infectadas com diferentes MOI (0,1; 1,0 e 5,0) do ZIKV e, posteriormente, marcadas com anexina V-FITC e 7-aminoactinomicina D (7AAD) para avaliar o perfil de apoptose, de acordo com as instruções do fabricante. A anexinaV-FITC (*BD Biosciences, Nova Jersey, EUA*) é um marcador que detecta a externalização da fosfatidilserina em células apoptóticas usando anexina V conjugada com o anticorpo FITC e 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (*Biolegend, San Diego, Califórnia, EUA*) é um intercalante fluorescente que sofre um desvio espectral quando associado ao DNA. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, usando o Citômetro Aria III (*BD Biosciences, Nova Jersey, EUA*).

### 5.12 Ensaio MTT- Methylthiazoletetrazolium

A viabilidade celular foi mensurada através do ensaio do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (Sigma). Para realização do ensaio, um total de  $3 \times 10^4$  células por poço foram semeadas em uma placa de 96 poços em 100  $\mu$ L de meio RPMI contendo 2% SFB nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Sucintamente, 10  $\mu$ L de uma solução de MTT (5mg/mL) foram adicionados aos poços e incubadas a 37°C por 4 horas. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 300 xg (TA) e tiveram seu sobrenadante retirado para neutralização da reação com adição de 100  $\mu$ L de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma). A viabilidade celular foi avaliada pela mensuração da absorbância a 540 nm, utilizando um leitor automático de placas. Todas as condições foram testadas em seis replicatas.

### 5.13 Extração de RNA celular e síntese do DNA complementar

As células THP-1 foram infectadas com o ZIKV como descrito anteriormente, e após serem ressuspendidas em meio RPMI-1640 a 2% SFB, foram distribuídas em placas de 6 poços e mantidas na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Em diferentes intervalos de tempo pós-infecção, os sobrenadantes foram aliquotados em tubos tipo “*ependorf*” e armazenados a -80°C, enquanto, que os *pellets* celulares foram ressuspendidos em tampão RLT, para extração de RNA de celular. Estas coletas foram realizadas nos intervalos: 0hpi, 6hpi, 12hpi.

O RNA das células foi extraído utilizando-se o kit de extração RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Califórnia, EUA), que tem como finalidade purificar o RNA a partir de pequenas quantidades de tecidos ou células, através de colunas de sílica. Todo o procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a extração, o RNA foi quantificado utilizando o *Qubit™ RNA HS Assay Kit* (ThermoFisher, Waltham, MA) e a qualidade do RNA foi determinada usando Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). O cDNA foi produzido utilizando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher, Waltham, MA) .

### 5.14 Expressão gênica

Para a determinação da expressão gênica foram realizadas 3 infecções das THP-1 com o ZIKV, utilizando as mesmas condições para a construção de um *pool* amostral. Três milhões de células foram infectadas usando um MOI de 5 e distribuídas em três poços de uma placa de 6 poços (um milhão em cada poço), um poço para cada tempo da incubação (0h, 6h e 12h). Três milhões de células foram utilizadas como controle da infecção e em substituição ao vírus foi adicionado meio de cultura e também distribuídas em três poços de uma placa de 6 poços (um milhão em cada poço). Após a adição do vírus, as células foram incubadas por duas horas em uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Após o período de incubação, o inóculo viral foi retirado e foi adicionado meio de cultura em todas as amostras. A amostra equivalente ao poço 0h foi coletada e centrifugada a 400g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aliqüotado e o pellet ressuspendido em 700 uL de tampão RLT para posterior extração de RNA celular, conforme descrito anteriormente. Esse procedimento foi repetido após 6 horas e 12 horas da retirada do inóculos, tanto para as amostras infectadas, como para as amostras controle.

Para realização do *CMV and MAPK Pathway TaqMan Array*® (ThermoFisher, Waltham, MA), em que foram avaliados 43 genes associados a via MAPK e 4 genes considerados endógenos. Os genes associados a via MAPK foram: *AKT1*, *ATF4*, *CHUK*, *CREB1*, *CREB3*, *CREB3L4*, *IKBKB*, *IKBKE*, *IKBKG*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MAP2K3*, *MAP2K6*, *MAP3K1*, *MAPK1*, *MAPK11*, *MAPK12*, *MAPK13*, *MAPK14*, *MAPK3*, *NFKB1*, *NFKB2*, *NFKBIA*, *NFKBIB*, *NFKBIE*, *PIK3C2A*, *PIK3C2B*, *PIK3C2G*, *PIK3C3*, *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CD*, *PIK3R1*, *PIK3R2*, *PIK3R3*, *PIK3R4*, *PIK3R5*, *RB1*, *REL*, *RELA*, *RELB*, *RPS6KB1*, *SP1*. *GAPDH*, *HPRT1*, *GUSB* e *ACTB*, foram como controles endógenos. O *fold-change* foi calculado pelo método  $\Delta\Delta C_t$ . Foram considerados genes superexpressos os genes que apresentaram expressão superior a duas vezes o limiar estabelecido pelo algoritmo em comparação com o grupo controle. Os genes considerados de expressão negativa, demonstraram expressão duas vezes menor o limiar estabelecido pelo algoritmo em comparação com o grupo controle.

### 5.15 Fosforilação de p38 MAPK

Para a realização da marcação da proteína p38MAPK fosforilada foram utilizadas  $1 \times 10^6$  células por condição, em triplicata. Na condição infectada, as células foram infectadas pelo ZIKV com o MOI de 5, incubadas por 1 hora a 37°C, a 5% de CO<sub>2</sub>. Logo após a infecção o inóculo foi retirado seguida da marcação da proteína alvo.

Para marcação da fosforilação de p38 MAPK foi utilizado anticorpo primário Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182; *Cell Signaling*) e o anticorpo secundário utilizado PE F(ab')<sub>2</sub> *Donkey anti-Rabbit IgG (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA)*, seguindo as instruções do fabricante. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, usando o Citômetro Aria III (*BD Biosciences, Nova Jersey, EUA*).

### 5.16 Immunoblot

As células infectadas foram mantidas em cultura por 15, 30, 45 e 60 minutos pós infecção e posteriormente, lisadas. Os precipitados de células para a extração protéica foram obtidos por meio de centrifugação celular. As proteínas foram extraídas em tampão de lise RIPA (*Sigma Aldrich, Burchs, SG, Switzerland*) contendo inibidores de proteases e fosfatases (*Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA*). Duzentos microlitros deste tampão foram adicionados sobre os precipitados celulares, os quais foram desagregados por pipetagem e mantidos no gelo por 30 minutos. Depois deste período foi realizada centrifugação a 14 000 rpm por 30 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram coletados. Todos os extratos protéicos foram imediatamente armazenados em freezer -80°C, no qual foram mantidos até a realização das análises subsequentes. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford usando reagente comercial, seguindo as instruções do fabricante (*Sigma Aldrich, Burchs, SG, Switzerland*).

#### 5.16.1 Western blotting (WB)

Para a detecção da fosforilação das proteínas p38 e JNK nas células infectadas, as proteínas foram extraídas e os extratos proteicos foram submetidos ao método de *Western Blot*. As amostras foram diluídas em tampão de Laemmli a

fim de se obter a quantidade de 30µg no volume final de 20 µL. Posteriormente, foram desnaturadas à 95°C durante 5 minutos e aplicadas em canaletas do gel de poliacrilamida de 12% para o seu fracionamento. Em um dos poços foram aplicados 5 µL do marcador de peso molecular pré corado (Thermo Scientific, EUA). A etapa subsequente à eletroforese foi a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose com o auxílio do sistema de transferência *Transf Dry* (BioRad).

A marcação das proteínas alvo foi realizada por meio do método de *Immunoblot*, seguindo os seguintes passos: após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, a mesma foi incubada por 2 horas imersa na solução de bloqueio (contendo TBS- Tween e 5% de leite desnatado) sob agitação a temperatura ambiente. Após essa etapa a membrana foi submetida a 3 lavagens com TBS-T (TBS 0,1% Tween), posteriormente, foi incubada *overnight*, sob agitação com o anticorpo primário *Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Antibody #9211* (Cell Signaling Technology®). Após essa etapa a membrana foi submetida à 3 lavagens e incubada com anticorpo secundário Goat pAb to Rb IgG (HRP) por duas horas, a temperatura ambiente, sob agitação. Posteriormente a membrana foi lavada com TBS-T e revelada no equipamento ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Para a marcação da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), o controle endógeno do experimento, foi utilizado o protocolo semelhante ao já descrito, havendo alteração a diluição do anticorpo primário, anti-GAPDH (diluição 1:1000).

### **5.17 Fosforilação das proteínas da via MAPK e JAK/STAT**

O *BD Phosflow™ Monocyte/NK Cell Activation Kit* (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA) foi usado para analisar a fosforilação das proteínas da via MAPK (ERK1/2, STAT1, STAT3, STAT5 e STAT6). Seguindo as instruções do fabricante. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, usando o Citometro Aria III (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA).

### 5.18 Inibição de p38 MAPK

O ensaio de inibição da p38MAPK foi realizado com o composto SB202190 (Sigma- Aldrich®), também conhecido como 4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole. O SB202190 é altamente seletivo para a p38MAPK, sendo capaz de inibir seletivamente a p38a e p38b e não tem efeito sobre a JNK, p42/44<sup>MAPK</sup> ou qualquer outra proteína quinase. A concentração de  $2,0 \times 10^6$  células por condição foi utilizada nesse experimento com condições pré-determinadas: células com 10uM de SB202190, células com 10uM de DMSO, células apenas com meio de cultura, células com 10uM de SB202190 e infectadas com ZIKV (MOI de 5), células com 10uM de DMSO e infectadas com ZIKV (MOI de 5), células infectadas com ZIKV (MOI de 5) com meio de cultura. As células infectadas foram mantidas em cultura por 6, 12, 24, 30, 48 hpi e posteriormente, os respectivos sobrenadantes foram coletados e os *pellets* armazenados para execução dos ensaios subsequentes.

### 5.19 Cytometric Beads Assay (CBA)

Os sobrenadantes de cultura de células THP-1 infectadas, em triplicata para cada condição, tiveram suas citocinas dosadas através dos kits de CBA de citocinas inflamatórias (*BD™ CBA Human Inflammatory Cytokines Kit®*; BD Biosciences, Nova Jersey, EUA), e CBA de quimiocinas (*BD CBA Human Chemokine Kit®*, BD Biosciences, Nova Jersey, EUA) seguindo as instruções do fabricante. As citocinas/quimiocinas IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL-10 e TNF- $\alpha$ , CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, CCL5/RANTES, e CCL2/MCP-1 foram dosadas. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, usando o Citômetro Calibur (*BD Biosciences, Nova Jersey, EUA*).

### 5.20 Considerações éticas

O presente estudo não utilizou nenhum material proveniente de amostras humanas nem envolveu o uso de animais vertebrados, portanto, não necessitou de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos nem do Certificado de Licença do Comitê de Ética no uso de Animais.



### 5.21 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada no programa GraphPad Prism Software 6.0, considerando um valor de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo. Os gráficos foram utilizados para apresentar as variáveis, medidas descritivas como média e desvio padrão. Os dados relativos foram testados quanto à normalidade usando o teste Kolmogorov-Smirnov. Para análise comparativa das variáveis quantitativas foram utilizados os testes *t-student* para comparação entre dois grupos, ou ANOVA para mais de dois grupos, quando observado o pressuposto de normalidade. Posteriormente, foi utilizado o pós-teste Bonferroni. Quando este não foi observado, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos ou Kruskal Wallis para comparação entre mais de dois grupos.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 As células THP-1 são suscetíveis à infecção do ZIKV

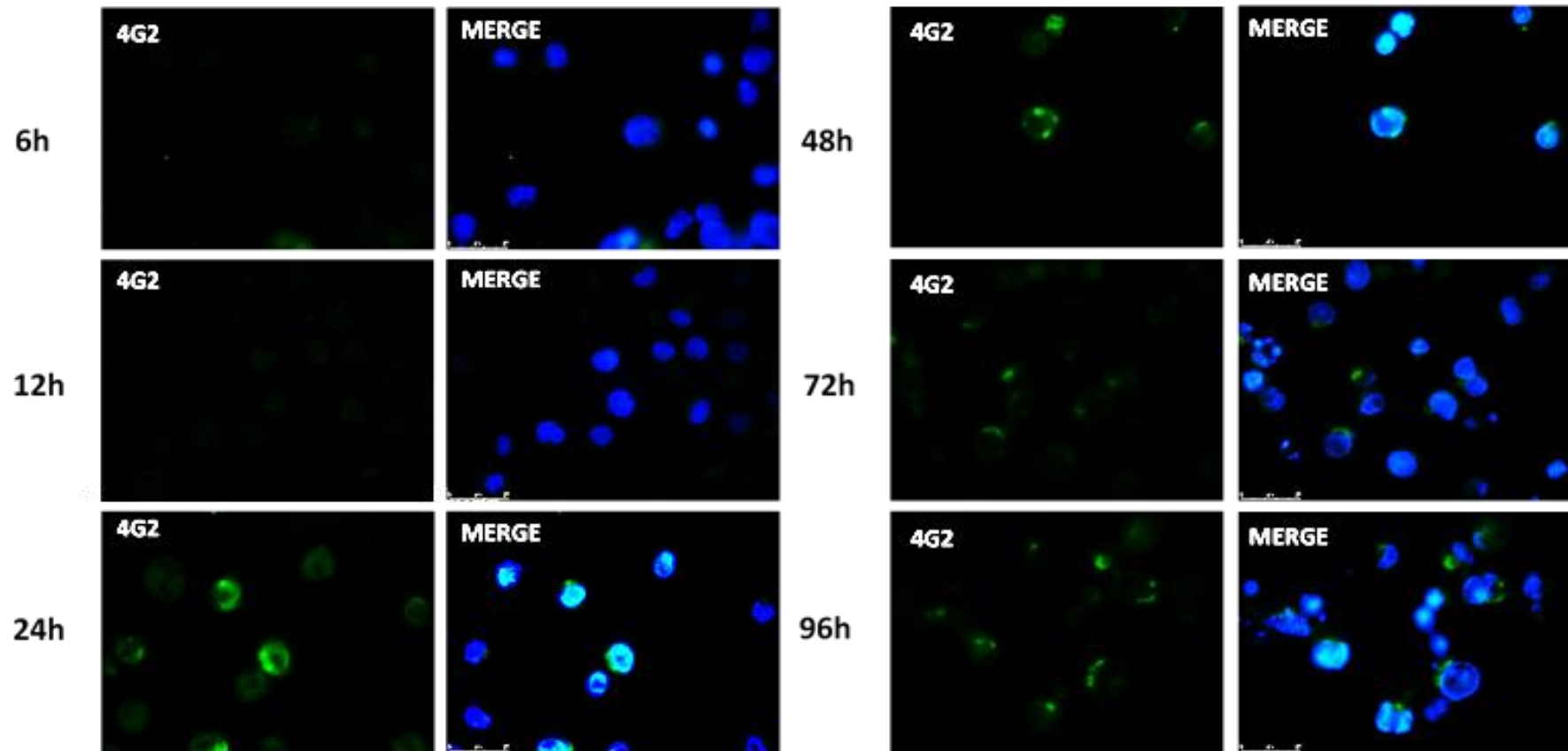
A determinação da permissividade e suscetibilidade das células THP-1 a infecção do ZIKV foi realizada pela marcação da proteína do envelope viral no interior das células. Além da detecção/quantificação do RNA e partículas virais no sobrenadante das culturas celulares, respectivamente.

O ensaio de imunofluorescência confirmou a presença do vírus no interior das células e conseqüentemente a sua permissividade à infecção. O ensaio também permitiu a visualização de alterações morfológicas nas células frente ao ZIKV. Foi observado o aumento de partículas virais com o passar das horas, começando nas 24 horas depois da infecção (Figura 7).

Além da imunofluorescência, para determinar a suscetibilidade e caracterização das células THP-1 no contexto da infecção do ZIKV, foi realizada a quantificação do material genético viral e das partículas infecciosas do sobrenadante da cultura celular por meio de RT-qPCR e ensaio de placas, respectivamente. Semelhante ao observado na microscopia de imunofluorescência, foi detectado o aumento da carga viral ao longo dos tempos pós-infecção. Em todas as MOIs avaliadas o número de cópias de RNA apresentam uma cinética semelhante, destacando uma redução da carga de RNA viral após 72 hpi, principalmente na MOI 0,1. Como esperado, a quantificação da carga de RNA viral nos sobrenadantes das THP-1 infectadas foi diretamente proporcional as MOIs utilizadas, ou seja, quanto menor a MOI, menor a carga viral, sendo assim, o MOI de 5 atingiu maior número de cópias de RNA viral quando comparado com os MOIs de 0,1 e 1,0 (Gráfico 1).

Resultado similar foi detectado no ensaio de placa, em que nos poços onde foram adicionados os sobrenadantes dos tempos iniciais de infecção (24h e 48h) o efeito citopático nas células foi mais intenso, conseqüentemente, a quantidade de partículas virais é maior nesse período. Com o passar do tempo esse efeito diminuiu, apresentando a menor quantidade de placas 96hpi. Não foi observado qualquer tipo de efeito nos poços onde foram adicionados os sobrenadantes das células não infectadas (Figura 8).

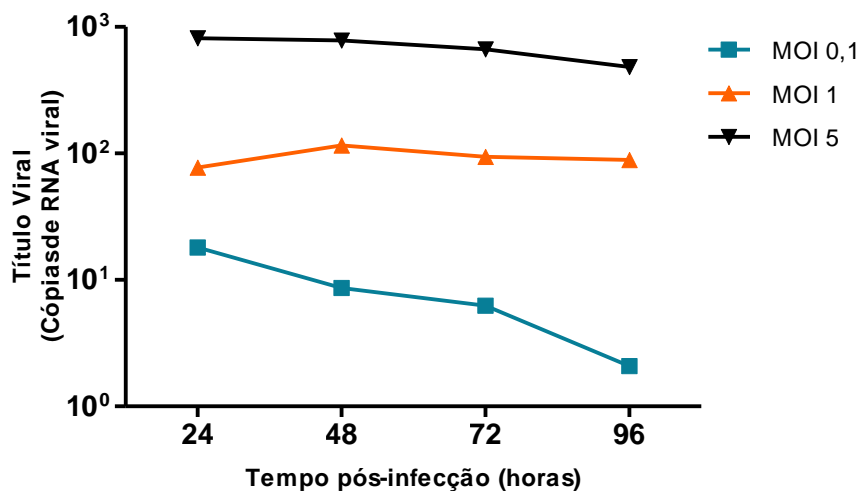
Figura 7- Marcação da proteína E do ZIKV em THP-1



Fonte: A autora.

Legenda: Imunomarcção da proteína E do ZIKV realizada utilizando o anticorpo 4G2 e núcleo da célula com DAPI  $1,0 \times 10^6$  células THP-1 infectadas com ZIKV (MOI 5), mostrando uma co-localização dos vírus e da célula. A IMF foi realizada com as células da cultura, em diferentes períodos pós-infecção: 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72horas e 96 horas.

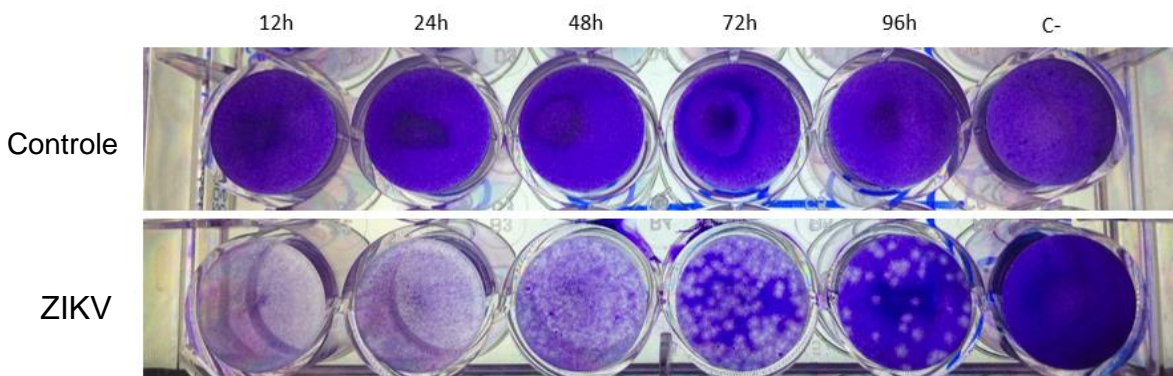
Gráfico 1- Curva da Carga Viral em THP-1 infectadas com diferentes MOIs do ZIKV



Fonte: A autora.

Legenda: Quantificação do RNA viral do ZIKV detectado por RT-qPCR em células THP-1 infectadas com diferentes MOIs.  $1,0 \times 10^6$  células THP-1 (por condição) infectadas com ZIKV com os MOIs de 0,1, 1 e 5. A curva de carga viral foi realizada no sobrenadante da cultura, em diferentes períodos pós-infecção: 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas.

Figura 8- Ensaio de placa dos sobrenadantes das células THP-1



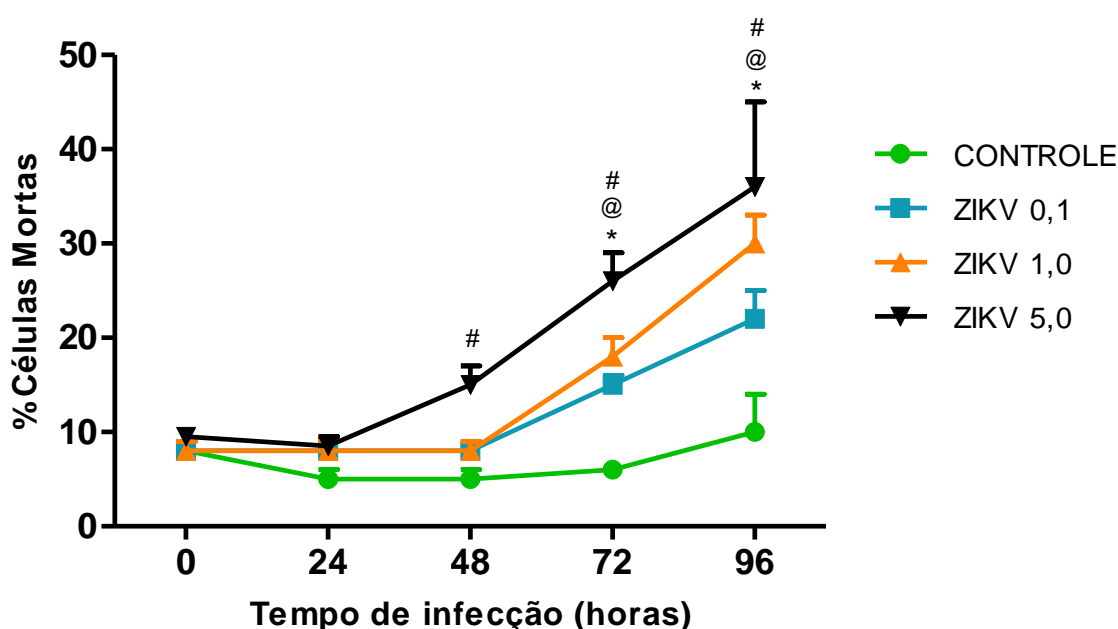
Fonte: A autora.

Legenda: Foram utilizadas  $1,0 \times 10^6$  células THP-1 infectadas com ZIKV (MOI 5), seus sobrenadantes coletados. E em placas de 24 poços, o inóculo nas células vero foi realizado a partir dos sobrenadantes da cultura, resultantes de diferentes períodos pós-infecção: 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas.

## 6.2 A viabilidade de células THP-1 diminui durante a infecção pelo ZIKV

O percentual de morte celular foi quantificado nas células THP-1 infectadas com diferentes MOIs do ZIKV e nos tempos iniciais (0hpi e 24hpi) não foram observadas diferenças significantes no percentual de células mortas. Foi observada diferença estatisticamente significante a partir de 48 hpi usando a MOI de 5. Nas horas subsequentes as todas em MOIs foi observada diferença estatística com  $P < 0.001$ .

Gráfico 2- Percentual de morte das células THP-1 infectadas com diferentes MOIs do ZIKV



Fonte: A autora.

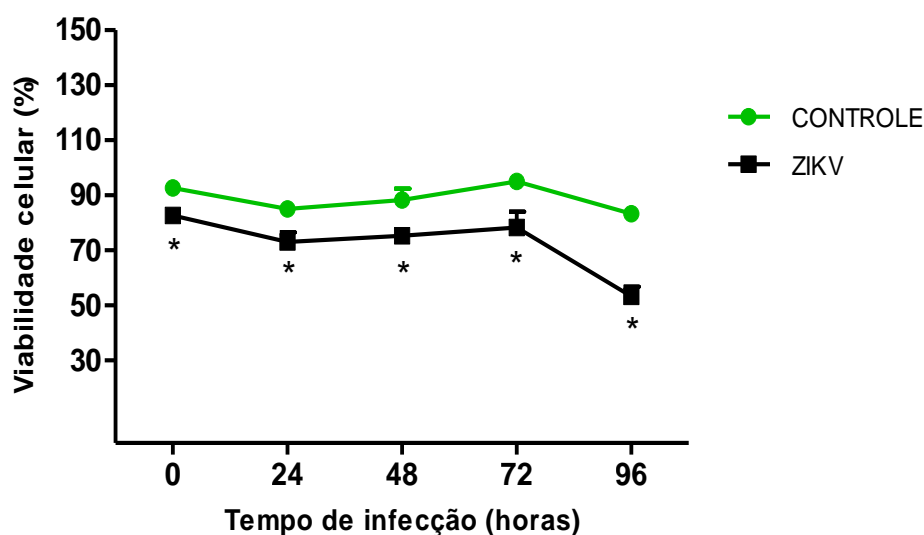
Legenda: Foram utilizadas  $1,0 \times 10^6$  células THP-1 por condição. Para as células infectadas com ZIKV foi usada a MOI de 5. As células THP-1 foram coletadas nos intervalos de 24 horas pós-infecção (0 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 120 horas), marcadas com anexina /7AAD e analisadas por citometria de fluxo. \*  $p < 0,001$  para comparação entre grupo controle e infectado com MOI 0,1.

@  $p < 0,001$  para comparação entre grupo controle e infectado com MOI 1,0 e #  $p < 0,001$  para comparação entre grupo controle e infectado com MOI 5. Análise estatística: Two-way ANOVA e o pós-teste Bonferroni.

Nas células infectadas, observa-se que há uma queda na viabilidade celular logo após a infecção, quando se compara as células controle com as células infectadas, essa diferença fica mais discrepante no intervalo de 96 hpi (Gráfico 4). Os resultados são confirmatórios quando se observa as imagens através da microscopia de campo claro (Figura 9).

Pode-se observar na imagem da Figura 9 que as células THP-1 se multiplicam ao longo do tempo no grupo controle, o que não é observado no grupo infectado. Ainda nas células infectadas, observa-se a formação de grumos celulares em 48h pós-infecção, o que não é visto no controle. Pode-se inferir que esses grumos celulares sejam um efeito citopático do vírus nesse modelo celular. Já em 72h e 96h, pode-se observar a diminuição no número de células nas amostras infectadas, enquanto que as células não-infectadas continuam se proliferando ao longo do tempo (Figura 9 B, painéis da direita).

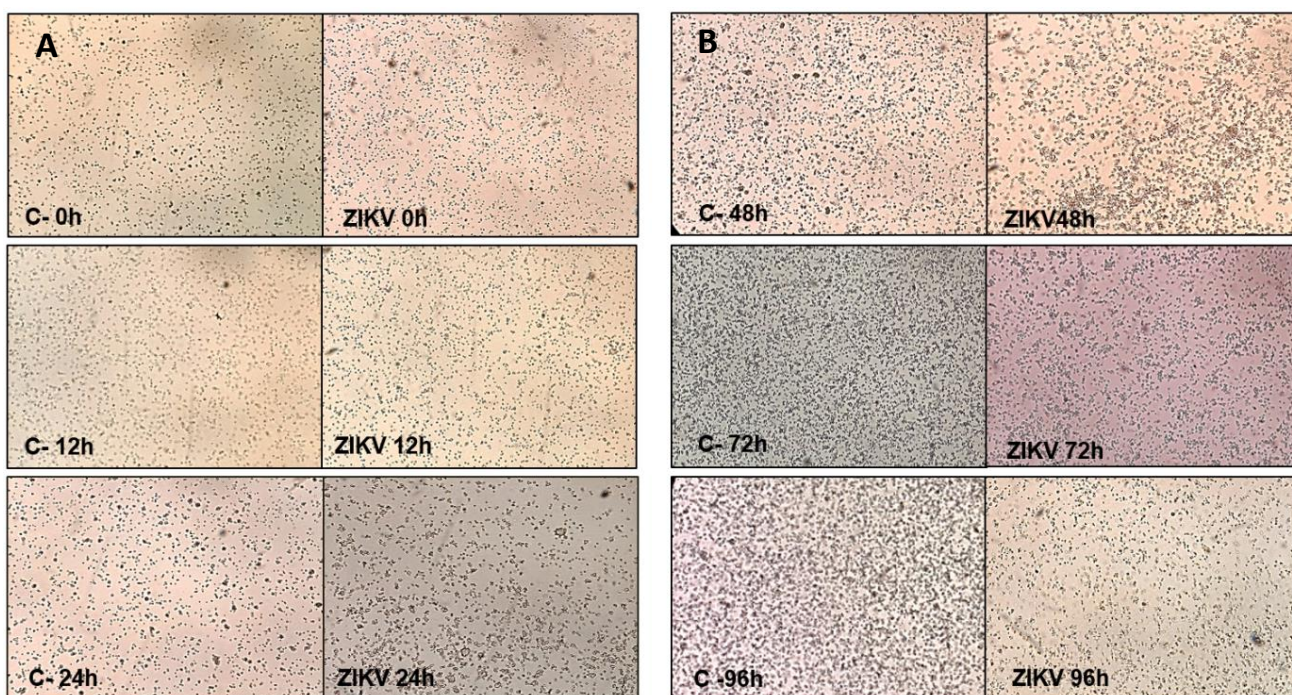
**Gráfico 3- Taxa de viabilidade das células THP-1 infectadas**



Fonte: A autora.

Legenda: Foram utilizadas  $1,0 \times 10^6$  células THP-1 por condição. Para as células infectadas com ZIKV foi usada a MOI de 5. A viabilidade celular realizada por MTT nas células da cultura, em diferentes períodos pós-infecção: 0 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas.

**Figura 9- Microscopia de campo claro das THP-1 infectadas com o ZIKV**



Fonte: A autora.

Legenda: Perfil morfológico e proliferação das células THP-1, apresentado em microscopia de campo claro das células da cultura, em diferentes períodos pós-infecção: 0 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas. Foram utilizadas  $1,0 \times 10^6$  células THP-1 por condição, as células infectadas com ZIKV(MOI 5).

### 6.3 As THP-1 infectadas com ZIKV superexpressam genes da via de NF- $\kappa$ B

Considerando que o ZIKV causa diminuição da viabilidade celular nas células THP-1, para compreender melhor o efeito dessa infecção, a expressão gênica da via MAPK foi analisada. Para isso, foi avaliada a expressão de 43 genes específicos da via de sinalização MAPK. São os genes :*AKT1*, *ATF4*, *CHUK*, *CREB1*, *CREB3*, *CREB3L4*, *IKBKB*, *IKBKE*, *IKBKG*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MAP2K3*, *MAP2K6*, *MAP3K1*, *MAPK1*, *MAPK11*, *MAPK12*, *MAPK13*, *MAPK14*, *MAPK3*, *NFKB1*, *NFKB2*, *NFKBIA*, *NFKBIB*, *NFKBIE*, *PIK3C2A*, *PIK3C2B*, *PIK3C2G*, *PIK3C3*, *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CD*, *PIK3R1*, *PIK3R2*, *PIK3R3*, *PIK3R4*, *PIK3R5*, *RB1*, *REL*, *RELA*, *RELB*, *RPS6KB1*.

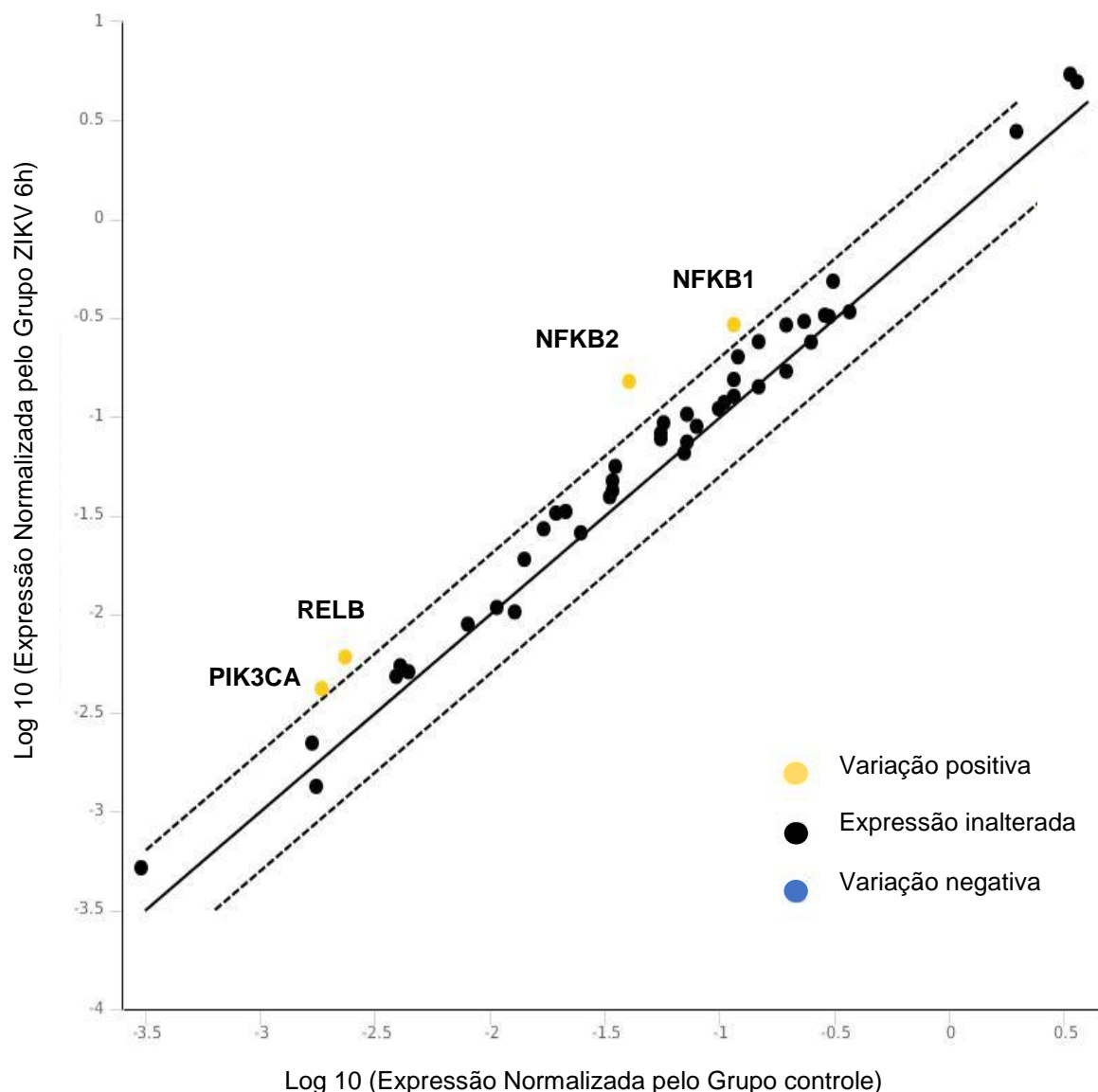
Desses genes, o *AKT1* codifica a proteína quinase serina/treonina, os genes, *ATF4*, *CREB1*, *CREB3*, *CREB3L4* são responsáveis pela codificação da proteína ligada ao elemento responsivo ao AMPc. Os genes *IKBKB*, *IKBKE*, *IKBKG* regulam a

inibição dos NF- $\kappa$ B $\beta$ , NF- $\kappa$ B $\epsilon$  e NF- $\kappa$ B $\gamma$ , respectivamente. Os genes *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MAP2K3*, *MAP2K6*, *MAP3K1*, *MAPK1*, *MAPK11*, *MAPK12*, *MAPK13*, *MAPK14* e *MAPK3* são responsáveis por codificar proteínas da família MAPK, como MEK1; MKK1, MEK2; MKK2, p38, MAPKKK1. O grupo dos genes *NFKB1*, *NFKB2*, *NFKBIA*, *NFKBIB* são responsáveis pela regulação e codificação do complexo proteico NF- $\kappa$ B. Já os genes *PIK3C2A*, *PIK3C2B*, *PIK3C2G*, *PIK3C3*, *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CD*, *PIK3R1*, *PIK3R2*, *PIK3R3* e *PIK3R4*, *PIK3R5* codificam isoformas das subunidades catalíticas da PI3K. O gene *RB1* é considerado um regulador negativo do ciclo celular. O *REL*, *RELA* e *RELB* são responsáveis por codificar subunidades de regulação de NF- $\kappa$ B e processos de sobrevivência celular. Esses genes de maneira geral estão relacionados com o processo de manutenção, proliferação celular, inflamação e sobrevivência celular.

Nos tempos pós infecção analisados, não houve variação na maioria dos genes avaliados. No tempo de 6h pi, quatro estavam superexpressos, *NFKB1*, *NFKB2*, *PIK3CA* e *RELB*. No tempo de 12h os genes que se apresentaram superexpressos foram: *AKT1*, *NFKB2*, *PIK3CA*, enquanto que o *PIK3C2G*, mostrou uma expressão negativa.



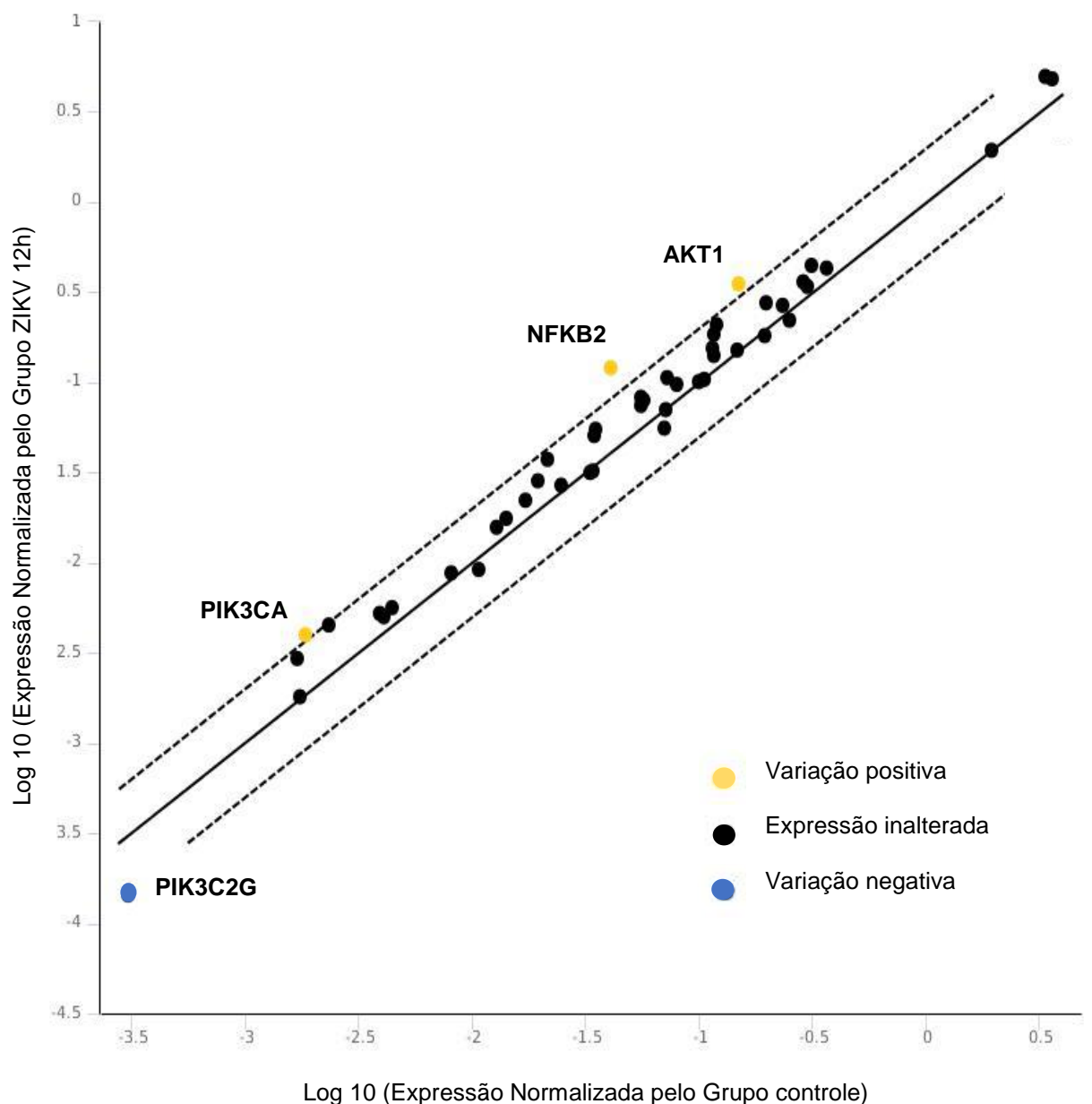
**Gráfico 4- Expressão de genes da via MAPK em células THP-1 após 6 horas da infecção pelo ZIKV**



Fonte: A autora.

Legenda: Gráfico de dispersão demonstrando a média da variação de expressão gênica em células não-infectadas (Grupo controle) e células infectadas com ZIKV e coletadas 6 hpi (Grupo ZIKV 6h). O eixo vertical mostra a expressão gênica normalizada do Grupo ZIKV 6h e o eixo horizontal mostra a expressão gênica normalizada do Grupo controle. Linhas pontilhadas delimitam o intervalo correspondente à variação de expressão 2,0. Variações de expressão com valores acima ou abaixo de 2,0 foram consideradas significativas, de acordo com a legenda do gráfico. A expressão gênica foi normalizada com os genes endógenos (GAPDH, HPRT1, GUSB e ACTB).

**Gráfico 5- Expressão de genes da via MAPK em células THP-1 após 12 horas da infecção pelo ZIKV**



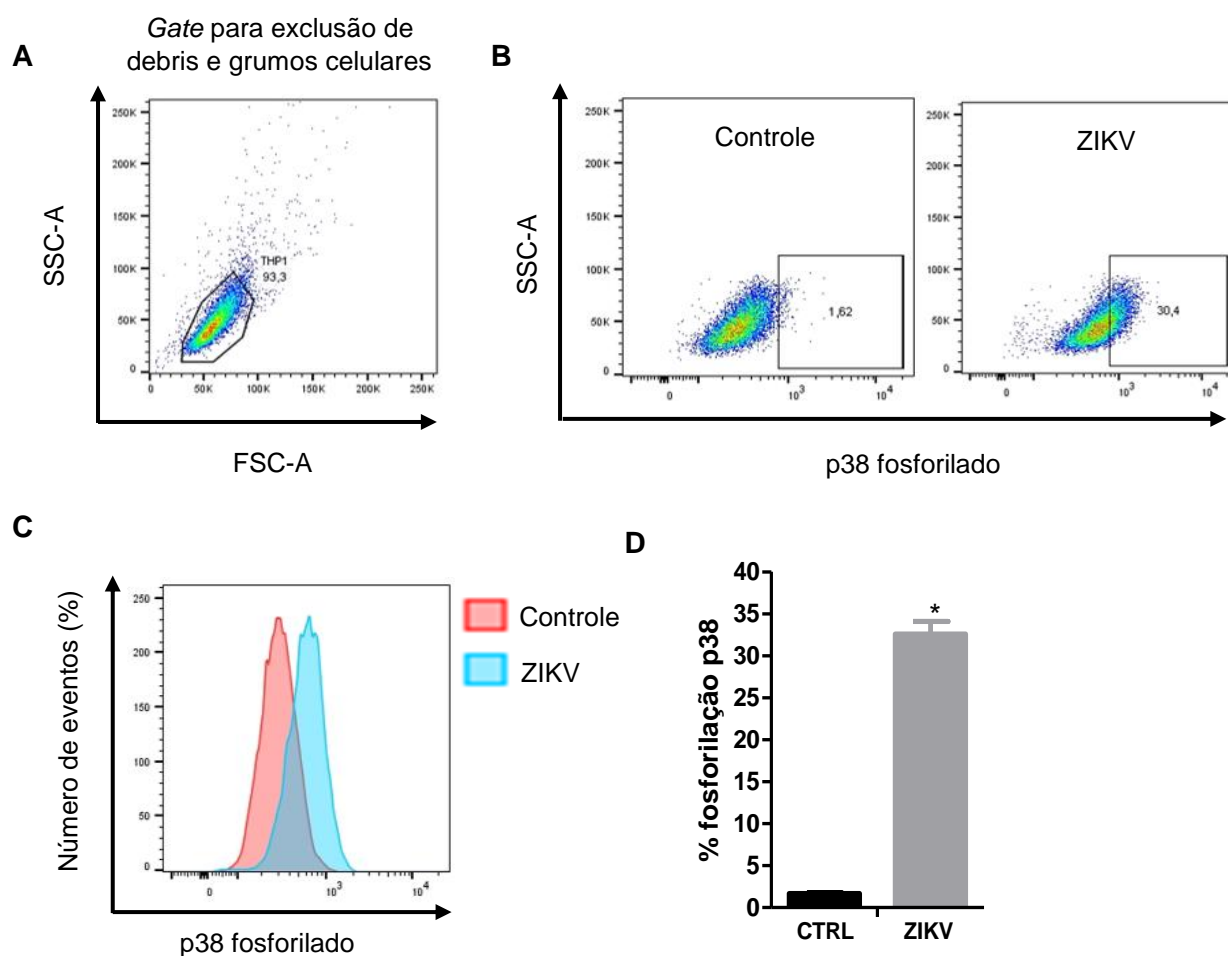
Fonte: A autora.

Legenda: Gráfico de dispersão demonstrando a média da variação de expressão gênica em células não-infectadas (Grupo controle) e células infectadas com ZIKV e coletadas 12 hpi (Grupo ZIKV 12hpi). O eixo vertical mostra a expressão gênica normalizada do Grupo ZIKV 12hpi e o eixo horizontal mostra a expressão gênica normalizada do Grupo controle. Linhas pontilhadas delimitam o intervalo correspondente à variação de expressão 2,0. Variações de expressão com valores acima ou abaixo de 2,0 foram consideradas significativas, de acordo com a legenda do gráfico. A expressão gênica foi normalizada com os genes endógenos (GAPDH, HPRT1, GUSB e ACTB).

#### 6.4 As THP-1 infectadas com ZIKV apresentam maior fosforilação de p38MAPK

A análise do processo de fosforilação de p38 foi realizada logo após a infecção pelo ZIKV por citometria de fluxo. Foi observado que as células infectadas apresentaram um aumento no percentual de fosforilação da quinase alvo quando comparado ao controle. A estratégia de *gates* foi demonstrada abaixo (Figura 10). É possível observar que ocorre um aumento da intensidade de fluorescência em células infectadas, quando comparado com células não-infectadas. Esse aumento é evidenciado pelo deslocamento para direita do pico da intensidade média de fluorescência no grupo infectado. Portanto, esses resultados sugerem que a presença do ZIKV aumenta a fosforilação de p38MPAK em células THP-1.

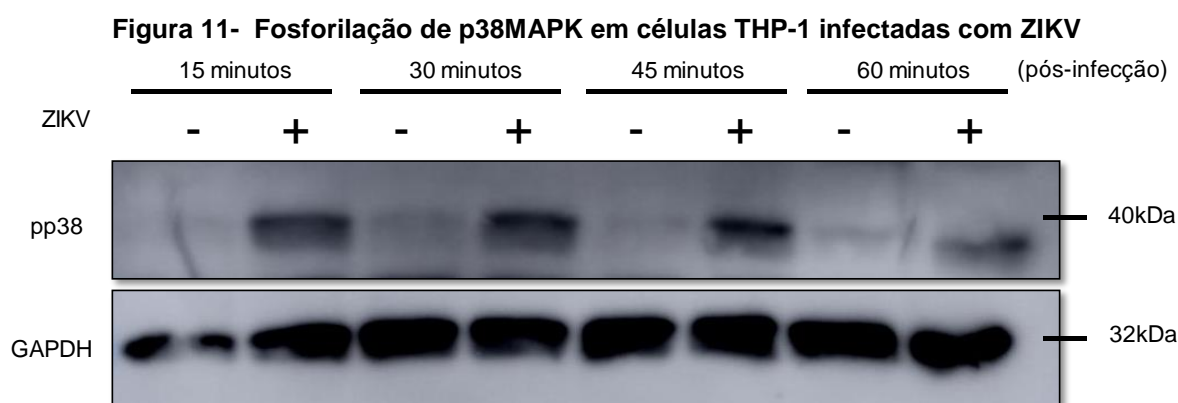
Figura 10- Fosforilação de p38MAPK em células THP-1 infectadas com ZIKV



Fonte: A autora.

Legenda: Células THP-1 infectadas com ZIKV com MOI de 5, foram coletadas após infecção, marcadas e analisadas para a fosforilação de p38MAPK por citometria de fluxo. O gráfico de barras representa o percentual de fosforilação.  $P < 0.001$  Análise estatística: teste-t.

Assim como observado por citometria de fluxo (Figura 10), é possível observar na Figura 11 que os níveis de fosforilação de p38 aumentam rapidamente em células infectadas. Já em 15 minutos pós-infecção observa-se o aumento nos níveis de p38 fosforilado, o que é consistente em todos os tempos pós-infecção analisados até 60 minutos pós-infecção.



Fonte: A autora.

Legenda: Células THP-1 infectadas com ZIKV com MOI de 5, foram coletadas em diferentes tempos (15,30,45 e 60 mpi) e analisadas para a fosforilação da p38MAPK por Western blot.

### 6.5O ZIKV interfere na fosforilação de STATs e ERK1/2 em THP-1

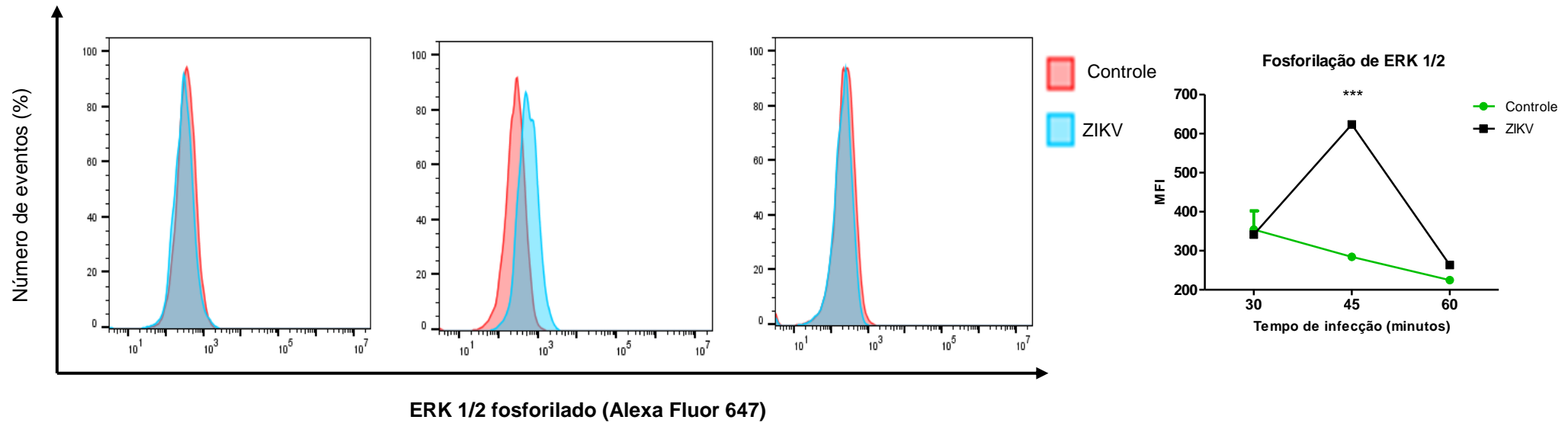
As células THP-1 foram infectadas com ZIKV, tiveram as marcações para avaliar as fosforilações das moléculas alvo foram efetuadas nos tempos de 30 minutos, 45 minutos e 60 minutos após a infecção. Esses intervalos foram determinados devido ao fatos de quinases, como Jaks, STATs, tem sua fosforilação iniciadas em 1-15 minutos após estimulação dos receptores (Shuai et al., 1993). Para entender melhor quais os mecanismos envolvidos na fosforilação de p38 durante a infecção pelo ZIKV. Foi analisado o status de fosforilação da proteína ERK1/2 e de diferentes proteínas STAT.

A fosforilação de proteínas importantes na imunidade inata foi vista em diferentes tempos após inoculação do ZIKV nas células THP-1. O grupo de células infectadas apresentou intensa fosforilação da proteína ERK1/2 nos 45 mpi quando comparadas com células não infectadas (Figura 12).

As STATs avaliadas nesse ensaio foram as STAT1, STAT3, STAT5 e STAT6. . A presença do ZIKV induziu a fosforilação de STAT1 nas THP-1, 30 e 60 mpi (Figura 13). Quanto a STAT 3, a presença do ZIKV induziu a sua fosforilação nos primeiros

30 mpi, porém, no último intervalo analisado (60 mpi) há uma inversão do perfil, com as células controle mostrando um maior nível de fosforilação. A STAT5 evidenciou maior fosforilação nos tempos iniciais pós infecção (30mpi e 45mpi) nas células infectadas do que nas células não infectadas. (Figura 14). Quanto a STAT6 diferenças estatisticamente significativas foram vistas em 45 e 60 mpi quando realizada a comparação entre os grupos, sendo observada uma maior fosforilação nas células controle em 45 mpi, enquanto que em 60 mpi o grupo infectado é que apresentou maiores níveis de fosforilação da proteína (Figura 15).

Figura 12- Histograma e gráfico das células THP-1 marcadas com anticorpo para ERK1/2, na presença e na ausência do ZIKV 30mpi, 45mpi e 60mpi



Fonte: A autora.

Legenda:  $1,0 \times 10^6$  células THP-1 infectadas com ZIKV (MOI 5). Fosforilação de ERK1/2 realizada nos de células infectadas e não infectadas, em diferentes períodos pós-infecção: 30, 45 e 60 mpi. Nota: \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ .

Figura 13- Histogramas e gráficos das células THP-1 marcadas com anticorpo para as STATs, na presença e na ausência do ZIKV 30mpi, 45 mpi e 60mpi (Continua)

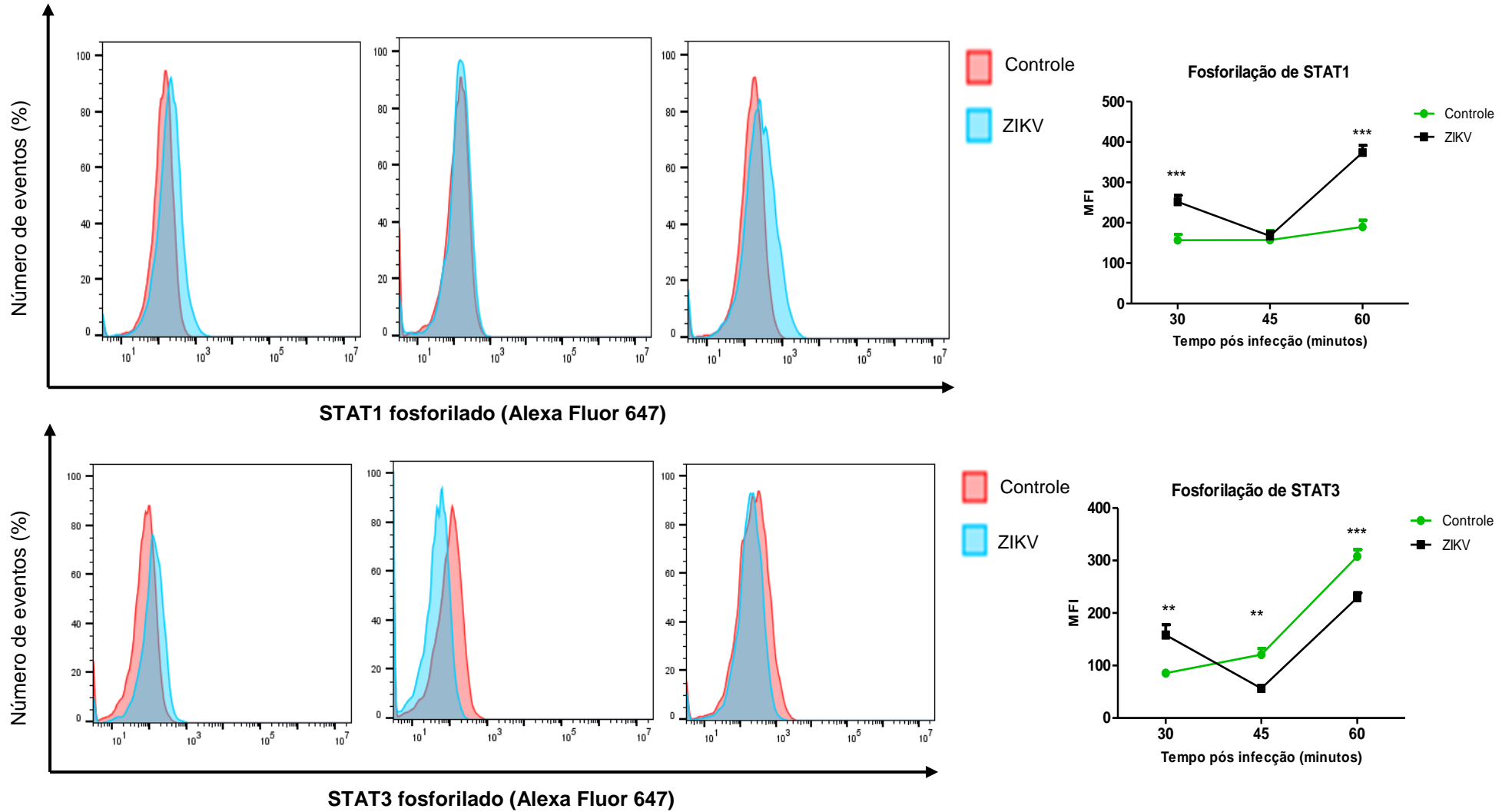
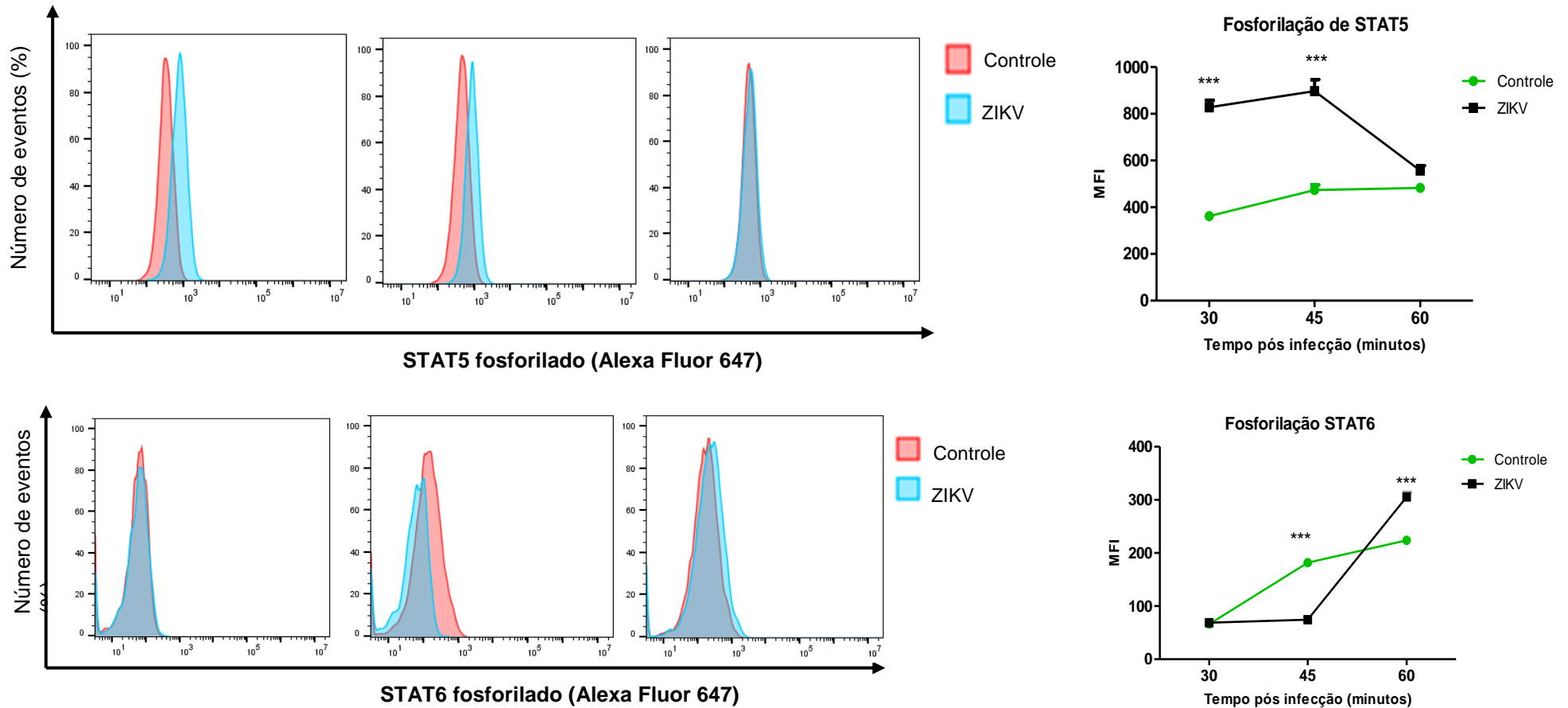


Figura 13- Histogramas e gráficos das células THP-1 marcadas com anticorpo para as STATs, na presença e na ausência do ZIKV 30mpi, 45 mpi e 60mpi (Conclusão)



Fonte: A autora.

Legenda:  $1,0 \times 10^6$  células THP-1 infectadas com ZIKV (MOI 5). Histogramas e gráficos demonstram a fosforilação de STAT1, STAT3, STAT5 e STAT6 realizadas nas células THP-1 infectadas e não infectadas, em diferentes períodos pós-infecção: 30, 45 e 60 mpi. Análise realizada por citometria de fluxo.

Nota: \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ .



## 6.6 A inibição de p38MAPK nas células THP-1 infectadas com o ZIKV interfere nos níveis de IL-8 e CXCL10

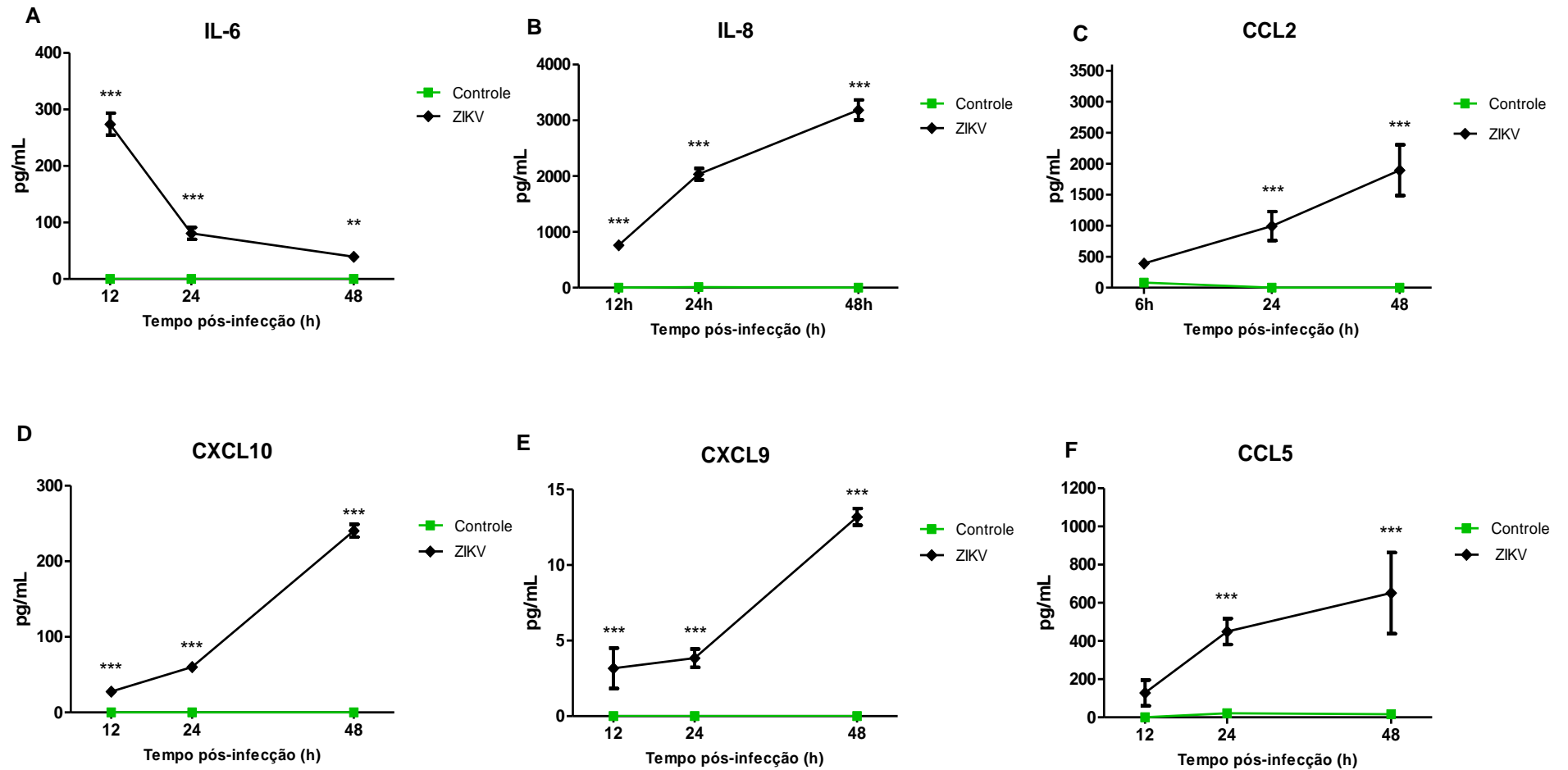
Os sobrenadantes resultantes da cultura de células THP-1 tratadas com o inibidor farmacológico de p38MAPK (SB202190) e não tratadas, células infectadas e não infectadas foram utilizados para dosagens das seguintes citocinas inflamatórias e quimiocinas: IL-12p70, TNF, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CCL2, CCL5, CXCL9 e CXCL10.

As citocinas IL-12p70, TNF, IL-10, IL-1 $\beta$  não demonstraram alterações de seus níveis, nas condições avaliadas, apresentando a concentração de 00,00 pg/mL em todas elas. As citocinas IL-6, IL-8 e as quimiocinas CCL5, CCL2, CXCL10 e CXCL9 tiveram seus níveis aumentados na maioria dos tempos analisados, nos sobrenadantes da cultura de células infectadas pelo ZIKV, quando comparadas com as células não infectadas. Sugerindo que o ZIKV induz um perfil pro-inflamatório nas células THP-1 (Gráfico 7).

De acordo com os dados do gráfico 8, o tratamento com o inibidor SB202190 não teve efeito consistente sobre as concentrações de algumas das citocinas/quimiocinas analisadas ao longo dos tempos pós-infecção. Esse é o caso de IL-12p70, TNF, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2, CCL5 e CXCL9. Isso sugere que a produção dessas moléculas possivelmente não depende exclusivamente da sinalização via p38MAPK.

A ação do inibidor foi diferente para cada um dos mediadores inflamatórios analisados. Para CXCL10 e IL-8, foi observado diminuição dos níveis dessas citocinas, sugerindo que são ativadas pela via MAPK dependente de p38MAPK. A infecção pelo ZIKV ativa a produção dessas citocinas por essa via. No entanto, não são produzidas exclusivamente por ela. Visto que, mesmo com a p38MAPK inibida ainda há produção das proteínas. Por outro lado, CCL2, CCL5, CXCL9 e IL-6 não apresentaram redução em seus níveis quando tiveram a p38MAPK inibida. E os mediadores IL-12p70, TNF, IL-10, IL-1 $\beta$  continuaram sem demonstrar variação em seus níveis.

Gráfico 6- Dosagem de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em células THP-1 infectadas pelo ZIKV



Fonte: A autora.

Legenda:  $1,0 \times 10^6$  células THP-1 infectadas com ZIKV (MOI 5). Dosagem das citocinas, IL-6, IL-8, CXCL10, CCL2, CXCL9 e CCL5 realizada nos sobrenadantes da cultura de células infectadas e não infectadas, em diferentes períodos pós-infecção: 0,12,24 e 48hpi. Nota: \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

Gráfico 7- Quantificação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em células THP-1 infectadas pelo ZIKV tratadas com inibidor de p38MAPK

(Continua)

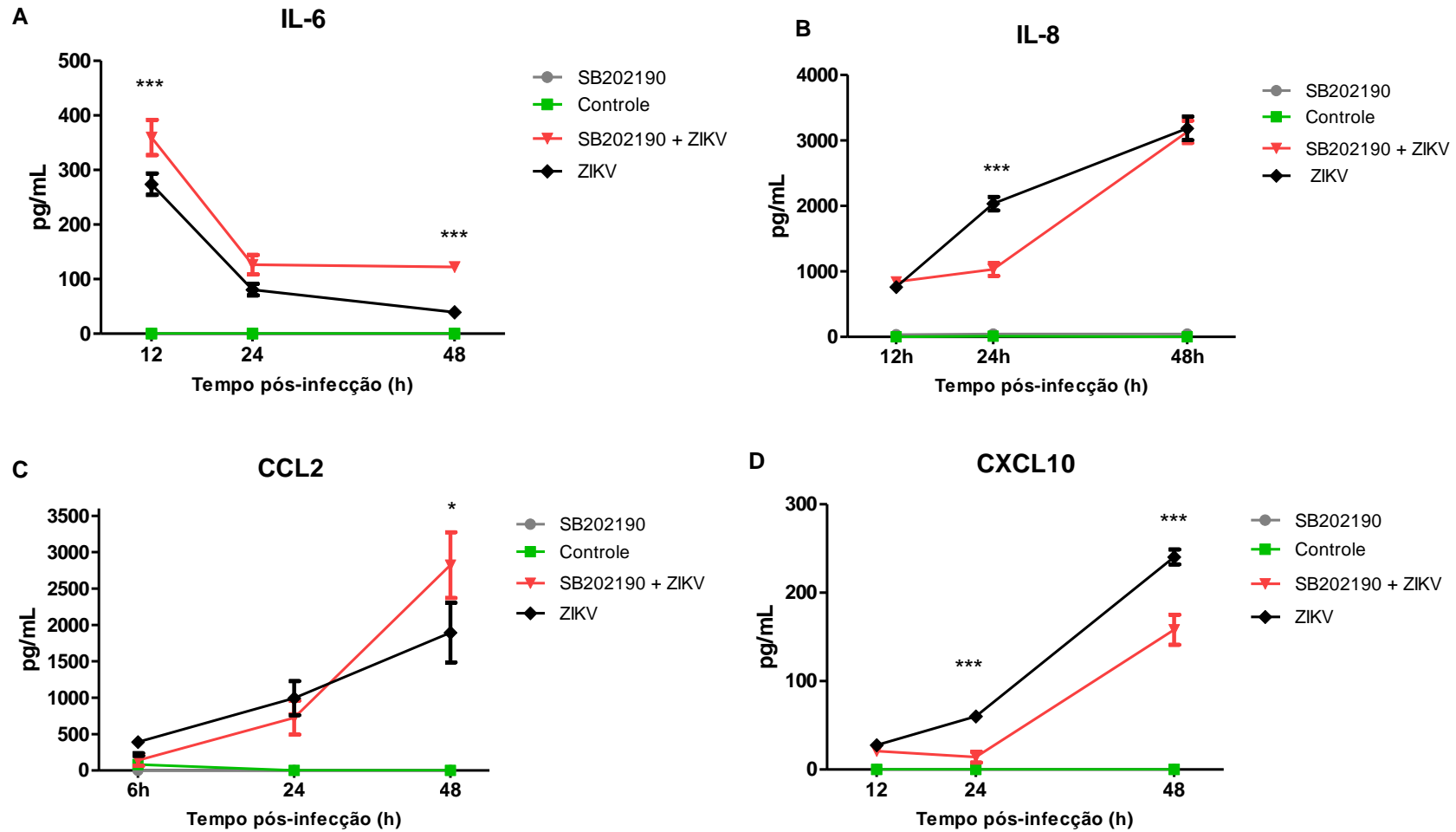
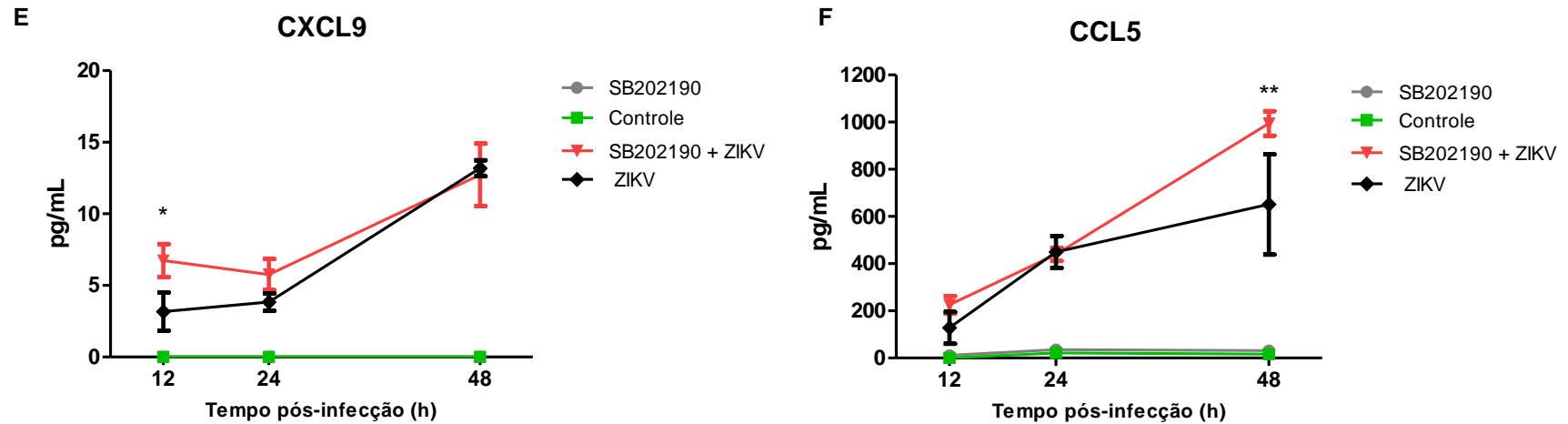


Gráfico 7- Quantificação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em células THP-1 infectadas pelo ZIKV tratadas com inibidor de p38MAPK

(Conclusão)



Fonte: A autora.

Legenda:  $1,0 \times 10^6$  células THP-1 tratadas com SB202190 e infectadas com ZIKV (MOI 5). As citocinas, IL-6, IL-8, CXCL10, CCL2, CXCL9 e CCL5 foram dosadas a partir dos sobrenadantes da cultura de células infectadas e não infectadas, em diferentes períodos pós-infecção: 12, 24 e 48hpi.

Nota: \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ .

## 7 DISCUSSÃO

O ZIKV tem demonstrado eficiente capacidade de infecção em diferentes tipos celulares (HAMEL et al., 2015; FOO et al., 2017; ZHU et al., 2017). Em um contexto sistêmico, para que o vírus consiga estabelecer a infecção, é necessário ultrapassar várias barreiras da imunidade. Já no ambiente *in vitro*, para que a infecção ocorra, é preciso que as células hospedeiras expressem receptores capazes de reconhecê-los. No caso da infecção dos flavivírus, os receptores de entrada bem caracterizados são as integrinas  $\alpha\beta3$ , receptores de lectina do tipo C (DG-SIGN) e receptores TAM (AXL, e Tyro3) (LAURETI et al., 2018; PERERA-LECOIN et al., 2013).

As células THP-1, células monocíticas de linhagem humana, demonstraram ser permissivas e suscetíveis à infecção do ZIKV. Tal característica permite uma avaliação *in vitro* dos perfis imunológicos resultantes da infecção com esse arbovírus. Curiosamente, as células THP-1 apresentam baixos níveis de expressão de receptores TAM, que são considerados os principais receptores de reconhecimento do ZIKV (LIAO et al., 2009). No entanto, apresenta expressão do receptor DC-SIGN, outro potencial receptor de entrada para esse vírus (HAMEL et al., 2015; HSU et al., 2010). Isso sugere que esse receptor, possivelmente, desempenha papel central na permissividade das células THP-1 ao ZIKV.

Considerando isso, nós avaliamos os mecanismos da imunidade inata de células THP-1 frente à infecção do ZIKV. Para isso, investigamos os níveis de expressão gênica e o status de fosforilação de proteínas da via MAPK, devido à relevância dessa via em atividades celulares como proliferação, diferenciação, migração, inflamação e apoptose. Outra via de sinalização que analisamos foi a via JAK/STAT, por também ser uma via envolvida na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, além de ativar de genes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6. Ainda, quantificamos citocinas e quimiocinas relacionadas com processos inflamatórios que geralmente são desencadeados em infecções virais.

De acordo com os resultados obtidos a cerca da expressão gênica da via MAPK, observamos que os genes *PI3KCA*, *AKT*, *NF-kB1* e *NF-kB2* estão superexpressos nas células infectadas quando comparados com as células não-infectadas. Além de estarem relacionados com mecanismos celulares diversos, incluindo replicação, migração e apoptose, estes genes parecem interferir na resposta

imune frente a infecções virais (PERERA-LECOIN et al. 2013; GREEN et al., 2014; LIU et al., 2014). Wang e colaboradores (2017) demonstraram que a via de sinalização PI3K é importante no controle de WNV, regulando a resposta do IFN-I. A inibição dessa via acarretou no aumento dos títulos virais em macrófagos de camundongos infectados pelo WNV. Por outro lado, um estudo de Liang *et al.*, (2016) constatou que a inibição da Akt-mTOR pode estar relacionada com defeitos na neurogênese e que a NS4A e NS4B do ZIKV pode ser responsável por processo inibitório.

No presente estudo, também avaliamos o status de fosforilação de STATs (STAT 1, STAT 3, STAT 5 e STAT 6) Os dados dessa avaliação sugerem que a infecção do ZIKV é capaz de ativar a cascata de sinalização JAK/STAT. Essa cascata é iniciada quando os seus receptores reconhecem citocinas, previamente liberadas. Mais de 50 citocinas são eficientes na ativação dessa via e esse amplo espectro varia desde citocinas antiinflamatórias (IL-4), pró-inflamatórias, a fatores de crescimento hematopoiéticos (G-CSF). A resposta intracelular está diretamente relacionada com o receptor que foi ativado e a via JAK/STAT será responsável por mediar a regulação das transcrições de genes ligados à proliferação, diferenciação e ativação celular, como o *NF-κB* (MULLER, 2019). Desse modo, alterações nessa via na infecção pelo ZIKV pode interferir em diversos processos essenciais no funcionamento da célula.

Além da fosforilação das STATs, quinases importantes da via MAPK também se mostraram ativadas frente ao ZIKV. Foram observados maiores níveis de fosforilação de ERK1/2 no intervalo de 45 mpi, quando comparado aos demais tempos analisados. Já a quinase p38MAPK apresentou alterações no status de fosforilação em todos os tempos pós-infecção analisados, embora com intensidades diferentes entre os intervalos. De modo semelhante, Zhu *et al.*, (2017) demonstraram, em células de retina, que o ZIKV ativa vias como a de ERK, p38MAPK, NF-κB, STAT3 e de estresse de retículo endoplasmático. Em conjunto, esses dados sugerem que a infecção pelo ZIKV parece regular essas vias em diferentes tipos celulares.

De acordo com o tipo celular, haverá a produção de diferentes IFNs ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\lambda$ ) e ativação dos ISGs. No entanto, o ZIKV mostrou ser capaz de inibir a expressão do gene induzido por IFN- $\alpha$ , podendo ser um dos mecanismos de evasão do vírus (KHAIBOULLINA et al., 2017). Nesse sentido é importante conhecer qual ou quais os

mecanismos que o ZIKV desempenha para minimizar essa resposta e conseguir estabelecer seus processos infecciosos (BAYER et al., 2016; WU et al., 2017).

Outros fatores inflamatórios podem ser induzidos em consequência da infecção com ZIKV, como citocinas e quimiocinas. Este trabalho mostra que o ZIKV além de se replicar bem nas células THP-1, desenvolve uma potente resposta inflamatória, com o aumento de IL-6, IL-8, CXCL10, CXCL9, CCL2 e CCL5. Estes resultados estão de acordo com dados de diversos estudos que também verificaram a elevação de moléculas inflamatórias na infecção do ZIKV porém discordam quanto a quantificação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (DA SILVA et al., 2019; LIMA et al., 2019; NAVECA et al., 2018; ORNELAS et al., 2017; TAPPE et al., 2016; WANG et al., 2018).

Para que a produção de IL-6 seja ativada, é necessário a participação de duas proteínas, o receptor de IL-6 (IL-6Ra, CD126) e a proteína gp130 (IL-6Rb, CD130). A IL-6 forma um complexo com IL-6R, presente nas células-alvo e recruta a gp130. O sinal de transdução mediada pela gp130 requer a ativação das vias JAK/STAT e MAPK (KISHIMOTO, 2010). Visto que os dados do nosso estudo sugerem que há ativação dessas vias em células THP-1 infectadas pelo ZIKV, é possível que essas vias estejam envolvidas no aumento dos níveis de IL-6.

Em relação ao aumento de IL-8 induzido pela infecção do ZIKV, provavelmente ocorre pela ativação das vias NF- $\kappa$ B, ERK, p38MAPK e PI3K/Akt uma vez que todas elas estão envolvidas na regulação da expressão desta citocina. Ainda baseado em nossos estudos, esse aumento, possivelmente, tem maior atuação da via p38MAPK. Isso também acontece no contexto da infecção por outros membros da família *Flaviviridae*, como DENV e o vírus da peste suína clássica. De acordo com Dong et al., 2018 a infecção com o vírus da peste suína envolve o aumento de IL-8 mediado pela regulação de PI3K/Akt, NF- $\kappa$ B, JNK, ERK, p38MAPK e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (DONG et al., 2018). A liberação de IL-8 também foi detectada na infecção de DENV e ZIKV (GREEN et al., 2014; LIMA et al., 2019).

Na infecção de DENV e ZIKV a participação importante de CXCL10, em processos inflamatórios, como a neuroinflamação já foi descrito (LIMA et al., 2019; NIRANJAN; MUTHUKUMARAVEL; JAMBULINGAM, 2019). HSIEH *et al.*, (2019) demonstraram que CXCR3 e CXCL10 são moléculas cruciais que coordenam a resposta de proteção contra a infecção do DENV. Nos achados do presente estudo também foi detectado o aumento de CXCL10 nas células infectadas com ZIKV. Isso

pode ser um indício da relação da participação dessa citocina na modulação imunológica da infecção do ZIKV, semelhantemente ao que acontece na infecção do DENV.

A quimiocina CXCL9 também chamada de MIG, é estimulada por IFN- $\gamma$  e diferentemente da CXCL10, não é induzida pelo IFN-  $\alpha/\beta$ . Juntamente com outras proteínas, como CCL2, CCL4, CXCL10/ IP-10 e IL-8, a CXCL9 tem estado associada à patogenicidade do vírus influenza sendo responsáveis pela modulação da resposta imunológica frente a esse vírus (BETÁKOVÁ et al., 2017). Na infecção de ZIKV em células-tronco neuroprogenitoras (LIMA et al., 2019), assim como em nosso estudo com células monocíticas, os níveis de CXCL9 se encontraram aumentados.

Também observamos o aumento de CCL2. Esse aumento já foi relatado em casos de infecção pelo DENV e ZIKV, esta quimiocina tem relação com o recrutamento de monócitos, linfócitos T e células NK, que são consideradas células importantes na resposta a infecção (BORGES et al., 2018; LIMA et al., 2019). CONNOR *et al.*, (2018) demonstraram que em monócitos infectados com ZIKV os níveis de CCL2 estão aumentados e ainda associaram este aumento com recrutamento de monócitos não-clássicos. Em conjunto, esses dados reforçam que há produção de CCL2 na infecção pelo ZIKV, sugerindo a participação dessa quimiocina na resposta inflamatória desencadeada por esse vírus

Ojha *et al.*, (2019) analisaram a produção do perfil inflamatório da infecção do ZIKV em astrócitos e observaram que o vírus induz o aumento da secreção de CCL2, CCL5, CXCL10, IL-8 and IL-6, semelhantemente ao nosso estudo Além disso, demonstraram que a cepa do ZIKV de Porto Rico (PRVABC59) estimulava ainda mais o aumento nos níveis de CCL5 quando comparada com a cepa africana (MR766).

Embora alguns estudos tenham demonstrado a produção de citocinas pró-inflamatórias na infecção pelo ZIKV (DONG et al., 2018; LIMA et al., 2019; NAVECA et al., 2018; ORNELAS et al., 2017; TAPPE et al., 2016), ainda não está claro quais são as mecanismos responsáveis por esse processo. Para elucidar alguns desses mecanismos, relacionamos a produção de algumas dessas moléculas (IL-6, IL-8, CXCL10, CXCL9, CCL2, CCL5) com uma via de sinalização, a via MAPK, capaz de regular inflamação. Para isso, inibimos a p38MAPK e dosamos as mesmos mediadores inflamatórios.



Nós observamos que a inibição de p38MAPK no grupo de células infectadas acarretou na diminuição dos níveis de IL-8 e CXCL-10, quando comparadas as células infectadas e não-tratadas com o inibidor. Esses dados sugerem que há uma forte relação entre essas moléculas e a via MAPK. Como foi visto em um estudo com células de retina infectadas com ZIKV, a inibição de p38MAPK foi capaz de reduzir os níveis do maior número de citocinas e quimiocinas avaliadas. Nesse mesmo estudo também foram inibidos JAK1/2, STAT3, a ativação de estresse de retículo endoplasmático, NF- $\kappa$ B e ERK. A inibição desses componentes acarretou na diminuição de citocinas e quimiocinas, incluíse IL-6, CXCL10, CCL5, CCL2, CCL7, ICAM 1 e CCL1, no entanto, no grupo p38MAPK inibido essa redução ocorreu de forma mais relevante (ZHU et al., 2017). Em conjunto, esses dados sugerem que a via p38MAPK parece ter papel central na indução de IL-8 e CXCL-10 na infecção pelo ZIKV em diferentes tipos celulares.

A sinalização de p38MAPK pode influenciar a produção de IFN e ISGs em diferentes níveis, esse processo pode acontecer devido a ativação de ATF-2, assim como regulação cruzada de NF- $\kappa$ B e IRF-3. Essa modulação da sinalização de IFN pode afetar a via de sinalização JAK/STAT Sendo assim, p38MAPK pode regular a sinalização de JAK/ STAT de forma indireta através da indução da fosforilação de STAT1 ou pela ativação da fosfolipase citosólica A2. Em um ciclo de *feedback* positivo, a modulação da sinalização de STAT pode influenciar a expressão de IFN (GALANI et al., 2017).

Em nosso estudo não avaliamos a relação da via MAPK e a sinalização de JAK//STAT, porém é possível que essa relação possa existir na infecção do ZIKV nas células THP-1. Observamos, que a inibição da p38MAPK contribuiu para a diminuição da produção de mediadores inflamatórios induzida pelo ZIKV. Nesse contexto, é importante entender também qual o papel das vias JAK/STAT e PI3K/Akt. Estudos futuros serão necessários para esclarecer o papel dessas vias no processo inflamatório desencadeado pelo ZIKV. A inibição intracelular de quinases pode exercer efeito imunossupressor de muitas células e de várias moléculas dependentes dessas proteínas. Em algumas doenças, como câncer e asma, por exemplo, a inibição de quinases como PIK3, p38 e JAK/STAT é utilizada como mecanismo de tratamento, visando diminuir o processo inflamatório decorrente da doença (SOUTHWORTH et

al., 2018). Isso reforça a importância da utilização de inibidores de quinases no estudo de mecanismos inflamatórios em diversas patologias.

Embora exista uma gama de citocinas/quimiocinas envolvida no contexto da infecção pelo ZIKV, moléculas como a IL-8 e CXCL10 podem representar marcadores importantes dessa infecção. O propósito em determinar marcadores e elucidar sua relação com os eventos que resultam no quadro mais grave da infecção pode levar a futuras estratégias terapêuticas e reduzir o impacto social e econômico da doença nas regiões mais afetadas. Mais estudo a cerca de processos inibitórios das quinases na infecção do ZIKV se faz necessário para que essas estratégias sejam efetivas.

## 8 CONCLUSÕES

- a) As células THP-1 são permissivas e susceptíveis a infecção do ZIKV;
- b) A infecção do ZIKV em células THP-1 induz a fosforilação da via de sinalização de JAK/STAT;
- c) As células THP-1 exibem um perfil pro-inflamatório quando infectadas com ZIKV;
- d) A p38MAPK regula parcialmente a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-8 e CXCL-10) liberadas pelas células THP-1 infectadas com ZIKV.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS A.; LITCHMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro. Elsevier. 2008.
- AHMAD, S. S. Y.; AMIN, T. N.; USTIANOWSKI, A. Zika virus : management of infection and risk. **British Medical Journal**, London, v. 1062, p. 1–5, Feb 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26920038>. Acesso em 20 fev. 2017.
- ALLISON, S. L. et al. Mapping of Functional Elements in the Stem-Anchor Region of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Protein E. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 73, n. 7, p. 5605–5612, 1999.
- ANGELETTI, S. et al. Phylogenesis and homology modeling in Zika virus epidemic: food for thought. **Pathogens and Global Health**, London, v. 110, n. 7–8, p. 269–274, 2016.
- ARAÚJO, H. R. C. et al. *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. **Insects**, Basel, v.6, n. 11, p. 576-594, 2015.
- ATKINSON, B. et al. Detection of Zika Virus in Semen. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 22, n. 5, p.940, 2016.
- BABON, J. J.; LIAU, N. P. D.; KERSHAW, N. J. JAK1 Takes a FERM Hold of Type II Cytokine Receptors. **Structure/Folding and Design**, Cambridge, v. 24, n. 6, p. 840–842, 2016.
- BACHILLER-LUQUE, P. et al. First case of imported Zika virus infection in Spain. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, Barcelona, v. 34, n. 4, p. 243-246, 2016.
- BANERJEE, S. et al. JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. **Drugs**, New York, v. 77, n. 5, p. 521–546, 2017.
- BAYER, A. et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection Against Zika Virus Infection. **Cell Host Microbe**. Cambridge, v.11; n.19(5), p.705–712, 2016.
- BERNABEI, P. et al. Interferon- $\gamma$  receptor 2 expression as the deciding factor in human T , B , and myeloid cell proliferation or death highly expressed on the membranes of T , B , and myeloid cells. **Journal of leukocyte biology**, New York, v. 70, n. 6, p. 950-960, 2001.
- BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus , French Polynesia , **Euro surveillance**, Saint-Maurice, v.19, n. 3, p. 8–11, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24721538>. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2018.
- BETÁKOVÁ, T. et al. Cytokines Induced During Influenza Virus Infection. **Current Pharmaceutical Design**, Saif Zonen, v.23, n. 18, p. 2616-2622, 2017.
- BOGOCH, I. I. et al. Potential for Zika virus introduction and transmission in resource

limited countries in Africa and Asia-Pacific : A modeling study. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 11, p. 1237–1245, 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 12, 2019. v. 50, n. 38, 2019. Disponível em: < <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/2019-013-Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-urbanas-transmitidas-pelo-Aedes-publicacao.pdf> > Acesso em: 02 agosto. 2019.

BORGES, M. B. et al. Characterization of recent and minimally passaged Brazilian dengue viruses inducing robust infection in rhesus macaques. **Plos One**, San Francisco, v.13, n. 4, p. 1–14, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5919018/>. Acesso em: 08 de março de 2018.

BOYCE, R. et al. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors : systematic literature review. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 564–577, 2013.

BRIANT, L. et al. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. **Virology**, New York v. 464–465, p. 26–32, 2014.

BRITO Zika Virus: A New Chapter in the History of Medicine. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v. 28, n. 6, p. 679-680, 2015.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak caused by Zika virus infection in French Polynesia. **Lancet**, London, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2017.

CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHERS, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 37–45, 2014.

CHARREL, R. N. et al. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 94, n. 8, p. 574- 584D, 2016.

COLAMONICI, O. R. et al. Interferon a ( IFN $\alpha$  ) Signaling in Cells Expressing the Variant Form of the Type I IFN Receptor . **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, n. 8, p. 5660–5665, 1994.

CONNOR, M. A. O. et al. Early cellular innate immune responses drive Zika viral persistence and tissue tropism in pigtail macaques. **Nature Communications**, London, n. 9:3371, 2018.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, London, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 2016.

CUADRADO, A; NEBREA, A. Mechanisms and functions of p38 MAPK signaling. **Biochemical Journal**, London, v. 429, n. 3, p. 403-417, 2010.

DAFFIS, S *et al.*, 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT Family members. **Nature**, London v. 468, p. 452–456, 2010.

DAPAT, I. C.; PASCAPURNAMA, D. N.; IWASAKI, H. Secretion of Galectin-9 as a

- DAMP during Dengue Virus Infection in THP-1 Cells. **International journal of molecular sciences**, Basel, v 18, n 8, p 1-20. 2017. Disponível em; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5578034/>. Acesso em: 18 de julho de 2018.
- DARBRO, J. M. et al. Effects of *Beauveria bassiana* on Survival , Blood-Feeding Success , and Fecundity of *Aedes aegypti* in Laboratory and Semi-Field Conditions. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 86, n. 4, p. 656–664, 2012.
- DICK, G. W. A. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.
- DICK, O.B. et al. Review : The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 87, n. 4, p. 584–593, 2012.
- DONG, W. et al. Classical Swine Fever Virus Infection and Its NS4A Protein Expression Induce IL-8 Production through MAVS Signaling Pathway in Swine Umbilical Vein Endothelial Cells. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 8, n. January, p. 1–14, 2018.
- DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Co-infection with Zika and Dengue Viruses in 2 Patients , New Caledonia , 2014. **Emerging infectious diseases**, Atlanta v. 21, n. 2, p. 381–382, 2015.
- DURHAM, G. A. et al. Targeting SOCS Proteins to Control JAK-STAT Signalling in Disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 40, n 5, p. 298-308, 2019.
- EHRHARDT, C. et al. Influenza A Virus NS1 Protein Activates the PI3K/Akt Pathway To Mediate Antiapoptotic Signaling Responses. **Journal of Virology**, Baltimore v. 81, n. 7, p. 3058–3067, 2007.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). Zika virus infection: Factsheet for health professionals. Factsheet for health professionals. Stockholm: ECDC, 2016. Disponível em: [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/zika\\_virus\\_infection/factsheet-health-professionals/Pages/factsheet\\_health\\_professionals.aspx#sthash.Ovu33Mb6.dpuf](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/zika_virus_infection/factsheet-health-professionals/Pages/factsheet_health_professionals.aspx#sthash.Ovu33Mb6.dpuf). Acesso em 20 de janeiro de 2017.
- ESPOSITO, S.; LONGO, M. R. Guillain–Barré syndrome. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam v. 16, n. 1, p. 96–101, 2017.
- FISH, E. N.; PLATANIAS, L. C. Interferon receptor signaling in malignancy: A network of cellular pathways defining biological outcomes. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, v. 12, n. 12, p. 1691–1703, 2014.
- FONSECA, K. et al. Case Report : First Case of Zika Virus Infection in a Returning Canadian Traveler. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 91, n. 5, p. 1035–1038, 2014.
- FONTES, B. M. Zika virus-related hypertensive iridocyclitis. **Arquivos Brasileiros de**

**Oftalmologia**, São Paulo, v. 79, n. 1, p. 63–63, 2016.

FOO, S. S. et al. Asian Zika virus strains target CD14 + blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. **Nature Microbiology**, London v. 2, n. 11, p. 1558–1570, 2017.

GALANI, V. et al. IFNs-signaling effects on lung cancer: an up-to-date pathways-specific review. **Clinical and Experimental Medicine**, Milano, v. 17, n. 3, p. 281–289, 2017.

GHOSH, A.; CHOWDHURY, N.; CHANDRA, G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 135, n. 5, p. 581–598, 2012.

GREEN, A. M. et al. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 426, n. 6, p. 1148–1160, 2014.

HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 2, 2012.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.

HERVAS-STUBBS, S. et al. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 17, n. 9, p. 2619–2627, 2011.

HO, T. W. et al. Guillain-Barre syndrome in northern China Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. **Brain : a journal of neurology**, London, v. 118 p. 597–605, 1995.

HSIEH, M. et al. Both CXCR3 and CXCL10/IFN-Inducible Protein 10 Are Required for Resistance to Primary Infection by Dengue Virus. **The Journal of immunology : official journal of the American Association of Immunologists**, Bethesda, v. 177, n. 3, p. 1855-63, 2019.

HSU, S. C. et al. Functional interaction of common allergens and a C-type lectin receptor, dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN), on human dendritic cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 285, n. 11, p. 7903–7910, 2010.

JUNJHON, J. et al. Influence of pr-M Cleavage on the Heterogeneity of Extracellular Dengue Virus Particles. **Journal of virology**, Baltimore, v. 84, n. 16, p. 8353–8358, 2010.

KANT, R. et al. Review of the bioenvironmental methods for malaria control with special reference to the use of larvivorous fishes and composite fish culture in central Gujarat, India. **Journal of Vector Borne Diseases**, Delhi, v. 50, n. 1, p. 1–12, 2013. Disponível em: <http://www.mrcindia.org/journal/issues/501001.pdf>. Acesso em: 30 de setembro de 2018.

KHAIBOULLINA, S. F. et al. ZIKV infection regulates inflammasomes pathway for replication in monocytes. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5700238/>.

Acesso em: 15 de março de 2018.

KISHIMOTO, T. IL-6: From its discovery to clinical applications. **International Immunology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 347–352, 2010.

KLEMA, V. J.; PADMANABHAN, R.; CHOI, K. H. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. **Viruses**, Basel, v. 13, n. 8, p. 4640–4656, 2015.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the Genus Flavivirus. **Journal of virology**, Baltimore, v. 72, n. 1, p. 73–83, 1998.

KUTSUNA, S. et al. Two cases of zika fever imported from french polynesia to Japan, December to January 2013. **Eurosurveillance**, Saint-Maurice, v. 19, n. 4, p. 1–4, 2014.

KYLE, J. L.; BEATTY, P. R.; HARRIS, E. Dengue Virus Infects Macrophages and Dendritic Cells in a Mouse Model of Infection. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v.195, n. 12, p. 1808-1817, 2007.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 14, n. 8, p. 1232-1239, 2008.

LANCIOTTI, R. S. et al. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere , 2015. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 22, n. 5, p. 2015–2017, 2016.

LAURETI, M. et al. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. September, p. 2180, 2018.

LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host Microbe**, Cambridge, v.19 n.5, p. 720–730, 2016.

LIAO, D. et al. Human protein S inhibits the uptake of AcLDL and expression of SR-A through Mer receptor tyrosine kinase in human macrophages. **Blood**, Washington, v. 113, n. 1, p. 165–174, 2009.

LIANG, Q. et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Dereulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. **Cell Stem Cell**. Cambridge, v.19, n. 5, p. 663–671, 2016.

LIMA CAMPOS, T. et al. Revisiting key entry routes of human epidemic arboviruses into the mainland americas through large-scale phylogenomics. **International Journal of Genomics**, New York, p.1-25, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6196792/>. Acesso em: 02 de abril de 2019.

LINDENBACH BD and RICE CM. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, v. 59, p. 23-61, 2003.

LINDENBACH BD, et al. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. Fields Virology, 6 ed. Lippincott Williams & Wilkins, New York, NY. 2013.

LIMA, M. C. et al. The transcriptional and protein profile from human infected neuroprogenitor cells is strongly correlated to Zika virus microcephaly cytokines phenotype evidencing a persistent inflammation in the CNS. **Frontiers in**



- Immunology**, Lausanne, v. 10, p.1- 36, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6707094/>. Acesso em: 13 de agosto de 2019.
- LIU, X et al. HIV-1 Nef Induces CCL5 production in astrocytes through p38-MAPK and PI3K/ Akt pathway and utilizes NF- $\kappa$ B, CEBP and AP-1 transcription factors. **Scientific Reports**. London, v.4, n. 4450, p. 1-23, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3963078/>. Acesso em: 05 de maio de 2019.
- LUM, F. et al. Zika Virus Infection Preferentially Counterbalances Human. **mSphere**, Washington, v. 3, n. 2, p. 1–18, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5874443/>. Acesso em: 04 de junho de 2019.
- MACNAMARA, F. N. Isolation of the virus as a diagnostic procedure for yellow fever in West Africa. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 11, n. 3, p. 391–401, 1954.
- MARANO, G. et al. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and Transfusion Medicine. **Blood transfusion**, Milano, v.14, p. 95–100, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786129/>. Acesso em: 04 de dezembro de 2016.
- MCCARTHY, M. Severe eye damage in infants with microcephaly is presumed to be due to Zika virus. **British medical journal**, London, p. 352, 2016.
- MCGRATH, E. L. et al. Differential Responses of Human Fetal Brain Neural Stem Cells to Zika Virus Infection. **Stem Cell Reports**, Cambridge, v. 8, p. 715–727, 2017.
- MING, G.;TANG, H and SONG, H. Advances in Zika Virus Research: Stem Cell Models, Challenges, and Opportunities. **Stem Cell Reports**, Cambridge, v. 19, p. 690-702, 2016.
- MINER, J. J. et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise Article Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, Cambridge, v. 165, n. 5, p. 1081-1091, 2016.
- MLAKAR, J. et al. Zika virus associated with microcephaly. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016.
- MUKHOPADHYAY, S. et al. Structure of West Nile Virus. **Science**, New York, v. 10, p.238, 2003.
- MULLER, R. JAK inhibitors in 2019, synthetic review in 10 points. **European Journal of Internal Medicine**, Amsterdam, v. 66, n.5 p. 9–17, 2019.
- MUSSO, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta v. 21, n. 10, p. 1887–1889, 2015.
- NAVECA, F. G. et al. Analysis of the immunological biomarker profile during acute zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 6, p. 1–13, 2018. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5961926/>. Acesso em: 25 de maio de 2019.

NGUYEN, K. B. et al. Interferon  $\alpha$  /  $\beta$  -mediated inhibition and promotion of interferon  $\gamma$ : STAT1 resolves a paradox. **Nature immunology**, New York, v. 1, p. 70-76, 2000.

NIRANJAN, R.; MUTHUKUMARAVEL, S.; JAMBULINGAM, P. The Involvement of Neuroinflammation in Dengue Viral Disease : Importance of Innate and Adaptive Immunity. **Neuroimmunomodulation**, Basel v.26, n. 3, p. 111–118, 2019.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro surveillance**, Saint-Maurice v. 1, n. 12, p. 7–9, 2014. Disponível em:

<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>.

Acesso em:12 de julho de 2017.

ORNELAS, A. M. M. et al. Immune activation in amniotic fluid from Zika virus–associated microcephaly. **Annals of Neurology**, New York v. 81, n. 1, p. 152–156, 2017.

OSTER, A. M. et al. Recommendations for men and their nonpregnant sex partners. **Health psychology**, Washington v. 65, n. 5, p. 2016–2018, 2019.

PENG, L. et al. Macrophage-activating lipopeptide-2 downregulates the expression of ATP-binding cassette transporter A1 by activating the TLR2/NF- $\kappa$ B/ZNF202 pathway in THP-1 macrophages. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 48, n. 4, p. 363–370, 2016.

PERERA-LECOIN, M. et al. Flavivirus entry receptors: An update. **Viruses**, Basel v. 6, n. 1, p. 69–88, 2013.

PESTKA S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v. 56, p.727–77, 1987.

PIERSON, T.C. and DIAMOND, M.S. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. **Current opinion in virology**, Amsterdam, v. 2, p.168–175. 2012.

PUERTA-GUARDO, H. et al. The Cytokine Response of U937-Derived Macrophages Infected through Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Disrupts Cell Apical-Junction Complexes and Increases Vascular Permeability. **Journal of virology**, Washington, v. 87, n. 13, p. 7486–7501, 2013.

QUICKE, K. M. et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. **Cell Host and Microbe**, Cambridge v. 20, n. 1, p. 83–90, 2016.

RAJ, C. et al. Toll-like receptor 3 regulates Zika virus infection and associated host inflammatory response in primary human astrocytes. **PloS One**, San Francisco, v14, n. 2 p. 1–26, 2019. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6368285/>. Acesso em: 17 de novembro de 2018.

RUBINFELD, H.; SEGER, R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.31, n. 2, p.151-174, 2005.

- SAUTEUR, P. M. M. et al. *Mycoplasma pneumoniae* triggering the Guillain-Barré syndrome : a case-control study. **Annals of neurology**, New York, v.80 n. 4, p. 566-580, 2016.
- SCHESSEL J et al. Infections and vaccinations preceding childhood Guillain–Barré symptom complex: a prospective study. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 165, n. p. 605–612, 2006.
- SHEA, J. J. O. et al. The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention, **Annual review of medicine**, Palo Alto, v, 66, p. 311–328, 2015.
- SHUAI, K. et al. Polypeptide signaling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. **Nature**, London, Inglaterra, v.366, p. 580-583, 1993.
- SILVA, M. H. M. et al. Innate immune response in patients with acute Zika virus infection. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin v. 208, n.6 , p.703-714, 2019.
- SIMMONDS, P. et al. Virus Taxonomy Profile : Flaviviridae. *Journal of General Virology*, London,v. 98,p. 2–3, 2017.
- SLAVOV, S. N. et al. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4855997/>. Acesso em: 24 de setembro de 2016.
- SONG, B. H. et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 308, p. 50–64, 2017.
- SOUTHWORTH, T. et al. PI3K, p38 and JAK/STAT signalling in bronchial tissue from patients with asthma following allergen challenge. **Biomarker Research**, London, v. 6, n. 14, p. 1–22, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5896031/> Acesso em: 14 de Setembro de 2018.
- STARK, G. R. et al. How Cells Respond. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v. 67, p. 227–64, 1998.
- STARK, G. R.; DARNELL, J. E. J. The JAK-STAT pathway at twenty, **Immunity** v. 36, n. 4, p. 503–514, 2012.
- STIASNY, K. et al. Structural Requirements for Low-pH-Induced Rearrangements in the Envelope Glycoprotein of Tick-Borne Encephalitis Virus. **Journal of virology**, Washington, v. 70, n. 11, p. 8142–8147, 1996.
- SUN, Y. et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, London, v. 35, n. 6, p. 600–604, 2015.
- TAPPE, D. et al. First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, **Euro surveillance**, Saint-Maurice,v. 19, n.4, p. 1–4, 2014. Disponível em :

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20685> Acesso em: 20 de outubro 2016

TAPPE, D. et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 205, n. 3, p. 269–273, 2016.

TIWARI, S. K. et al. Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow sustained infection. **Emerging Microbes and Infections**, New York, v. 6, n. 4, p. 1-24, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5457678/> Acesso em: 13 de agosto de 2017.

UDDIN, S. et al. Activation of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase by Type I Interferons . **Journal of biological chemistry**, Baltimore ,v. 274, n. 42, p. 30127–30131, 1999.

VENTURA, C. V. et al. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo v. 79, n. 1, p. 1–3, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abo/v79n1/0004-2749-abo-79-01-0001.pdf>

WANG, L. et al. From Mosquitos to Humans : Genetic Evolution of Zika Virus. **Cell host and microbe**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 561–565, 2017.

WANG, L et al. An essential role of PI3K in the control of West Nile virus infection. **Scientific Reports**. London, v. 7, p. 3724. 2017.

WANG, W. et al. Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 $\beta$  secretion. **Nature Communications**, London v. 9, n. 1, 2018.

WILLISON, JACOBS, VAN DOORN, Guillain-Barré syndrome. **Lancet**, London, v. 388, n.10045, p. 717-27, 2016.

WU, Y. et al. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the cooperation of multiple nonstructural proteins in vitro. **Cell Discovery**, London v. 3, p. 1–14, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5359216/>. Acesso em: 19 de novembro de 2018.

YUN, S. I.; LEE, Y. M. Zika virus: An emerging flavivirus. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 55, n. 3, p. 204–219, 2017.

ZAMMARCHI, L. et al. Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 63, p. 32–35, 2015.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v. 110, p. 569–572, 2015.

ZANLUCA, C.; SANTOS, C. N. D. Zika virus – an overview. **Microbes and Infection**, Paris, v. 18, n. 5, p. 295–301, 2016.

ZHANG, X. et al. CryoEM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. **Nature structural and molecular biology**, New York v. 20, n. 1, p. 105–110, 2013.

ZHU, S. et al. p38MAPK plays a critical role in induction of a pro-inflammatory phenotype of retinal Müller cells following Zika virus infection. **Antiviral research**. Amsterdam, v. 33, n. 8, p. 839–841, 2016.

ZÜST, R. et al. Ribose 2' - O -methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. **Nature immunology**, New York, v. 12, n. 2, p. 137–143, 2011.

## ANEXO A- DENGUE VIRUS-SPECIFIC ANTIBODIES ENHANCE BRAZILIAN ZIKA VIRUS INFECTION

The Journal of Infectious Diseases

BRIEF REPORT



### Dengue Virus–Specific Antibodies Enhance Brazilian Zika Virus Infection

Priscila M. S. Costa<sup>1,2</sup>, Edson J. M. Nascimento<sup>1,2</sup>, Cynthia Braga<sup>1,2</sup>,  
Marli T. Coimbra<sup>1</sup>, Otávio V. de Carvalho<sup>1,2</sup>, Leila R. de Mendonça<sup>1</sup>,  
Elisa A. N. Azevedo<sup>1</sup>, Rafael F. O. França<sup>1</sup>, Rafael Djalila<sup>1</sup>, and  
Ernesto T. A. Marques<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Aggeia Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Recife, <sup>2</sup>Faculty of Medical Sciences/Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Recife, <sup>3</sup>Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, Recife, and <sup>4</sup>Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil; and <sup>5</sup>Center for Vaccine Research and <sup>6</sup>Department of Infectious Diseases and Microbiology, University of Pittsburgh, Pennsylvania

Anti-Flavivirus antibodies are highly cross-reactive and may facilitate Zika virus (ZIKV) infection through the antibody-dependent enhancement (ADE) mechanism. We demonstrate that dengue-specific antibodies enhance the infection of a primary Brazilian ZIKV isolate in a FcγRII-expressing K562 cell line. In addition, we demonstrate that serum samples from dengue-immune pregnant women enhanced ZIKV infection. These findings highlight the need for epidemiological studies and animal models to further confirm the role of ADE in the development of congenital and neurological complications associated with ZIKV infections.

**Keywords.** Zika virus; antibody dependent enhancement; dengue antibodies.

Zika virus (ZIKV) is currently in the spotlight as a major public health concern worldwide [1]. Until recently, ZIKV infections in humans were associated with either asymptomatic or self-limiting exanthematic illness. However, the emergence of ZIKV in Polynesia and Brazil revealed the virus is associated with more severe clinical manifestations than previously reported, including neurological complications in adults (eg, Guillain-Barré Syndrome) and microcephaly in newborns [2–4].

The factors responsible for the large variability of severe phenotypes [3] of ZIKV infection remain unclear. Dengue virus (DENV) antibodies have been shown to enhance ZIKV infection [5, 6]. These antibodies cross-react with ZIKV structural proteins, facilitating virus uptake by cells expressing FcγR receptors through the mechanism of antibody-dependent enhancement (ADE) [5, 6]. Because of the high rate of dengue transmission in Brazil, >90% of the adult population has been previously exposed to DENV, especially in the Northeast region

[7]. Here, we used a panel of serum samples from individuals with different dengue immunity profiles to confirm that dengue antibodies enhance the infection of a Brazilian ZIKV isolate.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Sera Panel

We included well-characterized serum samples of (1) 6 laboratory-confirmed symptomatic dengue infections (primary and secondary dengue cases), (2) 20 pregnant women with different dengue immunity profiles, and (3) 3 dengue-naïve pregnant women.

Dengue symptomatic patient serum samples were collected from individuals enrolled in a cohort of dengue suspected cases conducted in the city of Recife [8], a large urban center and hyperendemic area of dengue in Northeast Brazil. Sequential blood samples were collected from each patient during the acute (<7 days) and convalescent phases (10–15 days) as well as around 30 days after enrollment in the study. Additional samples were obtained 6 and 12 months later. Dengue cases were laboratory confirmed by the combination of virus isolation in C6/36 cells and viral RNA detection by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with dengue serology for immunoglobulin M (IgM)/immunoglobulin G (IgG) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The kinetics of IgM and IgG response were used to classify the cases as primary or secondary dengue infections. For this study, we included serum samples from primary (n = 3) and secondary dengue cases (n = 3) collected at the following time points: <7 days, 10–15 days, 30–40 days, and >260 days after infection [8].

Serum samples were obtained from healthy pregnant women included in a prospective dengue birth cohort study carried out in the same setting [9, 10]. These samples were collected between 2011 and 2012 and represent the dengue epidemiological profile of women at reproductive age shortly before the circulation of ZIKV in this area. Dengue serological profiles of the mothers included in the cohort were determined by ELISA and plaque reduction neutralization test (PRNT) [9, 10]. To investigate ADE of ZIKV infection by DENV antibodies, 2 groups plus a control group of mothers were selected based on their PRNT status: Group I was comprised of serum samples from mothers with a monotypic DENV-immune profile (PRNT<sub>50</sub> > 20 to only 1 serotype; n = 10); and Group II included sera from mothers with multitypic immunity (PRNT<sub>50</sub> > 20 to >1 DENV serotype; n = 10) (Supplementary Table 2). Serum samples from DENV-naïve mothers enrolled in the cohort were also included in this study (n = 3). Samples were confirmed as DENV-negative by IgM/IgG serology and PRNT. Details of the study design and data collection of both cohort studies have been previously

Received 15 October 2016; editorial decision 19 December 2016; accepted 21 December 2016.  
Correspondence: E. T. A. Marques Jr, MD, PhD, Center for Vaccine Research, 3001 5th Ave, 3002 Biomedical Science Tower 3, Pittsburgh, PA 15261 (marques@pitt.edu)

The Journal of Infectious Diseases® 2017;000:00–00

© The Author 2016. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com.  
DOI: 10.1093/infdis/jw028

described [8, 9]. A detailed description of the serological characterization of each sera included in this study has been provided in Supplementary Tables 1 and 2.

#### Viruses

Zika virus PE/243 and DENV-2 16681 (prototype strain) were used in the ADE assay. Zika virus PE/243 was isolated from a Zika case diagnosed in Pernambuco state, Northeast Brazil [11]. The virus strains were propagated in Vero cells, as described elsewhere [10]. The virus-containing supernatants were harvested from infected Vero cells and clarified by centrifugation (930 g, 10 minutes, 4°C). Virus particles were precipitated with 50% polyethylene glycol (PEG 3100) in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM). Briefly, the supernatant/PEG mixture (proportion of 1:4) was incubated overnight at 4°C. After centrifugation (1500 g, 30 minutes, 4°C), the supernatant was discarded, and the pellet containing the virus particles was resuspended in one hundredth of the original volume of supernatant/PEG in DMEM with 25 mM of HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid). Zika virus PE/243 was titrated by plaque assay, whereas DENV-2 16681 virus titer was determined by focus-forming assay [10].

#### Antibody-Dependent Enhancement Assay

FcγRII-expressing K562 cell line were exposed to ZIKV PE/243 in the presence of either a *Flavivirus*-naïve (AB human serum) or a dengue-immune serum sample (DENV-3 immune serum). Antibody-dependent enhancement was determined by flow cytometry, as previously described [10]. Antibody-dependent enhancement was measured as the *n*-fold increase in the percentage of virus-infected cells relative to that in a *Flavivirus*-naïve serum. DENV-2 16681 was used as a control for the assay.

#### Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Zika virus RNA was extracted from culture supernatants using QIAamp Viral RNA extraction kit following the manufacturer's specifications. Quantitative RT-PCR was conducted by using the Quantifect Probe RT-PCR Kit with amplification in the Applied Biosystems 7500 real-time PCR system following the manufacturer's protocol. Zika virus primers (ENV1086F:5'-CCGCTGCCCAACACAAG-3' and ENV1162R:5'-CCACTAACGTTCTTTTCAGACAT-3') and probe (5'-VICAGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-BHQ1-3) sequences for the quantitative virus detection assay were designed according to Lanciotti et al (2008) [12]. The relative quantification of ZIKV RNA was assessed using the 7500 Software v2.0.6.

#### Ethical Statement

The protocol was approved by the Ethical Committee of Aggeu Magalhães Research Center (CAAE-0061.0.095.000-10) and of the Brazilian Ministry of Health (CONEP 25000.119007/2002-03; CEP68/02).

#### Statistical Analysis

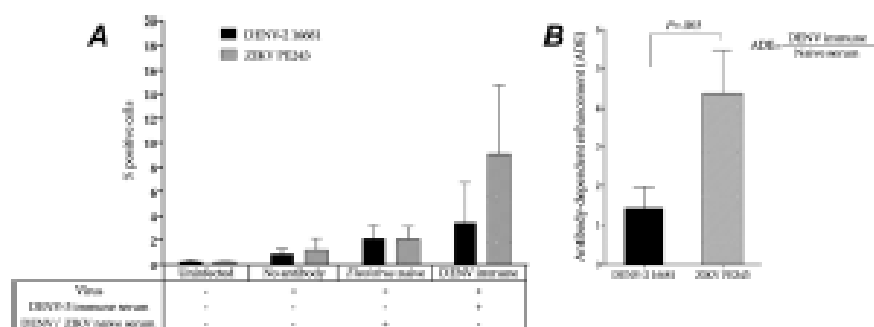
Student's *t* test was used to compare percentage of infected cells and enhancing activity between 2 groups. The correlation between previous dengue immunity and ADE was determined using the Spearman test. The level of significance was set at .05. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism, version 6.0e.

#### RESULTS

We postulated that nonneutralizing, cross-reactive, dengue-specific antibodies enhance ZIKV infection of FcγR receptor-bearing phagocytes through the mechanism of ADE. To confirm that, FcγRII-expressing K562 cell lines were exposed to the local Brazilian ZIKV isolate PE/243 in the presence of either a *Flavivirus*-naïve or a dengue-immune serum sample. Zika virus and DENV-2 infectivity were low on K562 cells infected without antibodies (1.23% ± 0.87% and 0.91% ± 0.38%, respectively) or in the presence of *Flavivirus*-naïve serum (2.05% ± 1.09% and 2.11% ± 1.11%, respectively). However, preincubation of ZIKV with a serum sample from a DENV-3-immune individual increased the infectivity of both viruses compared with the *Flavivirus*-naïve sample (9.09% ± 5.58% for ZIKV and 3.45% ± 3.20% for DENV-2). The ADE observed for ZIKV was 3 times greater than the one observed for DENV-2 (4.35 ± 1.11 and 1.43 ± 0.53, respectively; *P* = .003). The experiment was independently performed 4 times on different days to assure reproducibility. A representative analysis is shown in Figure 1A and 1B.

Next, we determined the kinetics of ADE of ZIKV infection in a panel of well-characterized serum samples from primary (*n* = 3) and secondary (*n* = 3) laboratory-confirmed dengue cases collected from acute (<7 days after onset of symptoms) and convalescent (10–15 days after onset of symptoms) phases until after complete recover (30–40 days and >280 days after onset of symptoms). Antibody-dependent enhancement of ZIKV infection was not observed in samples collected during the febrile and acute phases (before serum conversion) in patients experiencing dengue primary infections (Figure 2A). Antibody-dependent enhancement was only observed in this group at later time points, after convalescence and recovery (Figure 2A). In contrast, serum samples from dengue secondary cases induced ADE of ZIKV infection regardless of the phase of infection analyzed (Figure 2A).

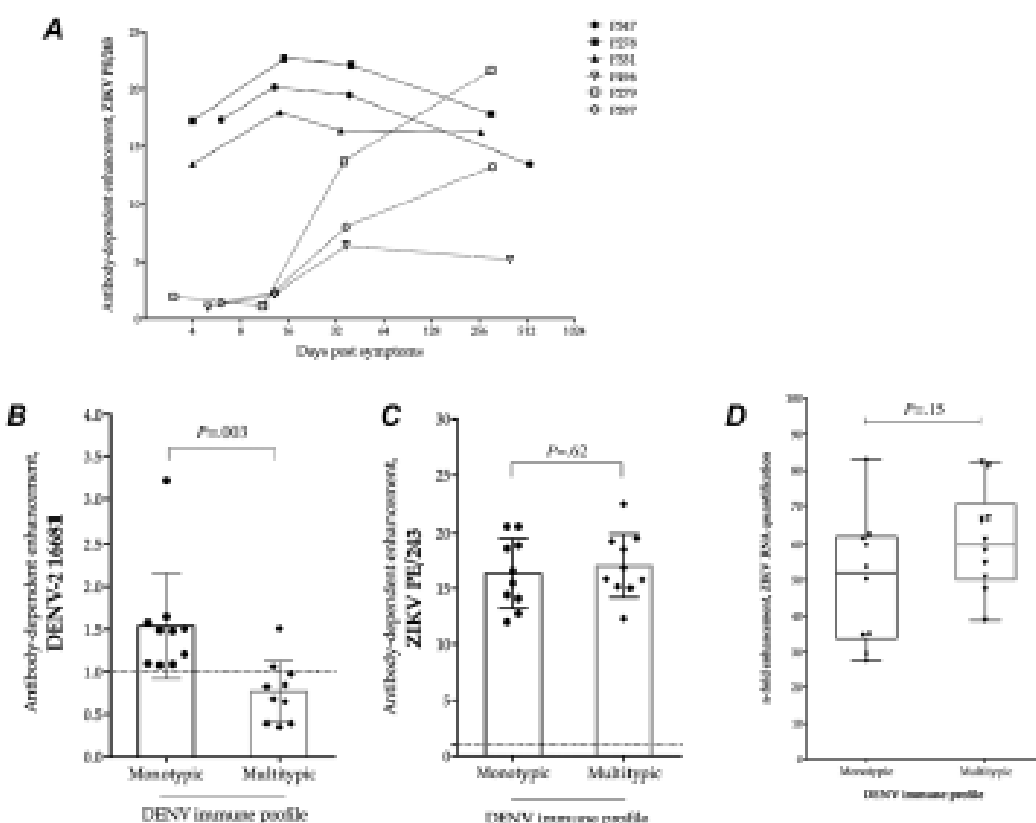
We then selected a panel of serum samples from pregnant women immune to either DENV-3 alone (monotypic; *n* = 10) or in combination with DENV-4 (multitypic; *n* = 10), as determined by PRNT assays. All samples from DENV-immune mothers show ADE of ZIKV infection (*n* = 20/20), whereas ADE was not observed among the DENV-naïve mothers (*n* = 0/3). Serum samples from monotypic and multitypic dengue-immune mothers induced greater ADE of ZIKV infection (16.41 ± 3.12 and 17.08 ± 2.86, for monotypic and multitypic, respectively,



**Figure 1.** Antibody-dependent enhancement (ADE) of Zika virus (ZIKV) infection by dengue-specific antibodies. FcγRI-expressing K562 cells were infected with ZIKV PE/243 in the absence of antibodies or in the presence of either a Flavivirus-naïve serum or a dengue virus (DENV)-3 immune serum. Antibody-dependent enhancement was measured as the *n*-fold increase in the percentage of virus-infected cells relative to that in a Flavivirus-naïve serum. **A**, Percentage of DENV- and ZIKV-infected K562 cells in absence or in presence of serum. **B**, Antibody-dependent enhancement of ZIKV in K562 cells.

as compared with DENV-2 ( $1.54 \pm 0.62$  and  $0.76 \pm 0.36$ , for monotypic and multitypic, respectively) (Figure 2C and 2B). However, immunity to multiple DENV serotypes inhibited

the infectivity of DENV-2 ( $P = .003$ ; Figure 2B), whereas ADE of ZIKV was elevated in monotypic and multitypic groups ( $P = .62$ ) (Figure 2C).



**Figure 2.** Antibody-dependent enhancement (ADE) of Zika virus (ZIKV) infection by dengue antibodies. **A**, Longitudinal serum samples from dengue-infected patients were used to determine the kinetics of ADE of ZIKV infection after dengue exposure in individuals experiencing a primary (dotted lines) or secondary (solid lines) dengue infection. Antibody-dependent enhancement of dengue virus (DENV) (**B**) and ZIKV (**C**) was tested in the presence of a panel of serum samples from pregnant women with different dengue immune status, as determined by plaque reduction neutralization test: monotypic (DENV-3) ( $n = 10$ ) and multitypic (DENV-3 and DENV-4) ( $n = 10$ ). **C**, The *n*-fold increase in the ZIKV RNA quantification in the presence of monotypic or multitypic dengue immune serum relative to that in a Flavivirus-naïve serum. ADE, Antibody-dependent enhancement; DENV, dengue virus; ZIKV, Zika virus; vRNA, virus ribonucleic acid.



Antibody-dependence enhancement of ZIKV infection by dengue-specific antibodies was also observed after quantification of viral RNA by quantitative RT-PCR in culture supernatants of infected K562 cells. Viral RNA levels increased up to 7-fold in the presence of dengue immune serum compared with the *Flavivirus*-naïve serum (Figure 2D). There was no difference in the ZIKV RNA levels collected from supernatants harvested from infected cells in the presence of dengue monotypic or multitypic maternal sera ( $P = .15$ ).

## DISCUSSION

Although ZIKV has been linked to the increased incidence of congenital microcephaly cases [3, 4], the mechanisms underlying ZIKV transmission from mother to fetus remain unknown. Here, we demonstrated that the presence of dengue antibodies increased the infectivity of a primary Brazilian ZIKV isolate in a human cell line expressing FcγRII receptors.

Antibody-dependent enhancement of ZIKV infection in mononuclear phagocytes was first evidenced in the 1980s [13] and has been recently confirmed by others [5, 6]. Dejnirattisai et al [5] showed that pooled convalescent serum and monoclonal antibodies derived from DENV-infected patients were able to promote ADE of ZIKV infection on the monocyte cell line U937 [5]. Our results confirmed these findings in a different cell line and also explored the kinetics of ADE on paired samples taken from the same subjects at different time points, contributing to better understanding of how preexisting *Flavivirus* immunity influences ZIKV infection *in vitro*. We acknowledge that it is not possible to definitively rule out previous ZIKV exposure of the patients included in our study, although there were no reports of ZIKV or microcephaly outbreaks in Brazil between 2004–2006 and 2011–2012, when the samples were collected. Of note, monoclonal antibodies directed to the envelope dimer epitope of DENV have been recently demonstrated to potentially neutralize ZIKV infection and inhibit ADE *in vitro* [5, 14], pointing to a potential immunotherapy against ZIKV and opening the venues for the identification of ZIKV and DENV shared epitopes able to elicit neutralizing antibodies against both viruses [14].

Interestingly, we showed that sera from pregnant women—representative of the pregnant population of Recife, which was the epicenter of the microcephaly epidemic in Brazil—promote ADE of ZIKV infection *in vitro*. Noteworthy, increased numbers of congenital disease associated with ZIKV infection have not been reported in Southeast Asia countries [15], where dengue has been hyperendemic for >5 decades and pregnant women are usually immune to all DENV serotypes. Unlike Asia, pregnant women from our setting are mostly immune to DENV-3 alone and probably have lower levels of DENV-associated antibodies than women exposed to several DENV infections [10]. Thus, we cannot exclude the possibility that background immunity and

DENV-specific antibody levels of the population might contribute to increased disease severity of ZIKV infections. This probably explains the higher rates of congenital syndrome and neurological complications associated with ZIKV infections observed in Brazil compared with Asian countries [4, 15], although virus virulence of the circulating ZIKV might also play a role.

In summary, we demonstrated that dengue-specific antibodies dramatically increase ZIKV infectivity *in vitro* in phagocytes expressing FcγRII receptors. This finding might have implications for the immunopathogenesis of ZIKV infection in dengue-endemic areas. We acknowledge that the influence of ADE in determining severe disease *in vivo* has been controversial in the dengue field [10]. To date, there has been no epidemiologic evidence of enhanced ZIKV illness during the ongoing epidemic in South and Central America. Although our data clearly demonstrate the ability of dengue antibodies to enhance ZIKV infection *in vitro*, it is important to point out that the relevance of this mechanism *in vivo* must be carefully explored. Additional epidemiological and animal model studies are needed to elucidate the contribution of previous dengue immunity in mediating congenital and neurological complications associated with ZIKV infections.

## Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

## Notes

**Acknowledgments.** We thank Dr Renato Oliveira and Ms Verônica Gerson (Aggeu Magalhães Research Center) for reagents, help with cytometry, and samples selection. We also thank Dr Donald Burke for advice and invaluable discussion.

**Financial support.** This work was supported by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES); Center for Vaccine Research, University of Pittsburgh; Fogarty Training Program (D43TW006682 Piv CHDTP/ 323 NIH to P. M. S. C.); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (482915/2010-2 MCT/CNPq-321 14/2010); Strategic Program to Support Health Research/PAPES VI (322 407697/2012-8); and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (U19 AI56541).

**Potential conflicts of interest.** All authors. No reported conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

## References

1. Leisher J, Chatswin LJ, Kuzirka LM, et al. Assessing the global threat from Zika virus. *Science* 2016; 352:aal0160.
2. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* 2016; 387:1531–9.
3. Moore CA, Staples JE, Dobyns WA, et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital zika syndrome for pediatric clinicians. *JAMA Pediatr* 2016 E1–8. doi:10.1001/jamapediatrics.2016.3982.

- de Araújo TV, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis* 2016; 16:1356–63.
- Dejnathat W, Supan T, Wongwat W, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nat Immunol* 2016; 17:1102–8.
- Priyavada LI, Quicke KM, Hudson WH, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113:7032–7.
- Braga C, Lima CJ, Martelli CM, et al. Seroprevalence and risk factors for dengue infection in socio-economically distinct areas of Recife, Brazil. *Acta Trop* 2010; 113:224–30.
- Cordeiro MT, Silva AM, Brito CA, et al. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77:1120–24.
- Braga C, Albuquerque MFM, Cordeiro MT, et al. Prospective birth cohort in a hyperendemic dengue area in Northeast Brazil: methods and preliminary results. *Cad Saude Publica* 2016; 32:1–11.
- Castanha PME, Braga C, Cordeiro MT, et al. Placental transfer of dengue-specific antibodies and kinetics of dengue infection enhancing activity in Brazilian infants. *J Infect Dis* 2016; 214:625–32.
- Donald CL, Brunan B, Chambersworth SL, et al. Full genome sequence and siRNA interferon antagonistic activity of Zika virus from Recife, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10:e0005048.
- Lancioth RS, Kosoy CL, Larsen JL, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:1232–9.
- Pajhiani AH, Hjalstad SB, Marchette NJ, Larsen E. Cross-infection enhancement among African flaviviruses by immune mouse ascitic fluids. *Cytobios* 1987; 49:49–55.
- Swanson JA, Platts JA, Platts KS, et al. Dengue virus envelope direct epitope monoclonal antibodies isolated from dengue patients are protective against Zika virus. *MBo* 2016; 19:1–8.
- Durbin AP. Dengue antibody and Zika: friend or foe? *Trends Immunol* 2016; 37:525–6.

## ANEXO B- ENHANCEMENT OF ZIKA INFECTION BY DENGUE- SPECIFIC ANTIBODIES DOES NOT ALTER THE PRODUCTION OF INTERLEUKIN 6 IN FCYRIII-EXPRESSING K562 CELLS

7. Quicke KM, Bowen JR, Johnson EL, et al. Zika virus infects human placental macrophages. *Cell Host Microbe* 2016; 20:83–90.
8. Boonnak K, Dambach KM, Donofrio GC, Tassaneeritthep B, Marovich MA. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol* 2011; 85:1671–83.
9. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine—40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:1–21.
10. Grant A, Ponta SS, Tripathi S, et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host Microbe* 2016; 19:882–90.

Received 11 June 2017; editorial decision 17 July 2017; accepted 17 August 2017.

Correspondence: S. Mahalingam, PhD, Emerging Viruses and Inflammation Research Group, Institute for Glycomics, Griffith University, Gold Coast, QLD 4202, Australia (s.mahalingam@griffith.edu.au).

*The Journal of Infectious Diseases*® 2017;216:612–4  
© The Author 2017. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com.  
DOI: 10.1093/infdis/jix144

### Enhancement of Zika Infection by Dengue-Specific Antibodies Does Not Alter the Production of Interleukin 6 in FcγRIII-Expressing K562 Cells

**TO THE EDITOR**—We thank Hueston and colleagues for their comments about our manuscript and for sharing their results [1]. Indeed, antibody-dependent enhancement (ADE) of virus infection is a complex phenomenon. The mechanism is triggered by the attachment of immune complexes to Fcγ receptors, leading to an increased number of virus-infected cells (extrinsic ADE) and/or to the modulation of the antiviral signaling pathway (intrinsic ADE) [2].

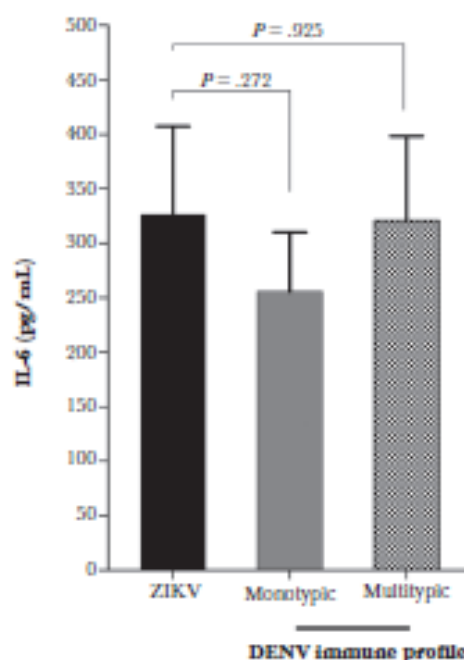
In dengue, the relevance of ADE in driving the severe outcomes of the disease have been demonstrated in experimental studies conducted *in vitro* and *in vivo* [2, 3]. Additionally, it has been established that secondary infection with a heterologous dengue virus (DENV)

serotype is a risk factor for the development of severe disease [4]. Another unique example of ADE in mediating severe outcomes is the fact that infants born to DENV-immune mothers might develop severe dengue during a primary infection when maternally transferred dengue antibodies have waned to below protective levels [5].

In children and adults, the spectrum of the clinical manifestations of Zika virus (ZIKV) infection is normally much less symptomatic when compared to dengue (dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome). However, ZIKV has the ability to infect embryos and fetuses inside the uterus, causing devastating pathology. The mechanisms underlying this severe outcome of ZIKV infection remain unknown, and several

studies have focused on investigating whether ADE might have contributed to the expanded ZIKV pathogenesis [1, 6–8]. Collectively, these studies have confirmed (*in vitro* and *in vivo*) that ADE of ZIKV infection by dengue-specific antibodies not only facilitates viral uptake, as demonstrated by our study and by others, but also modifies antiviral mechanisms, resulting in increased ZIKV replication, as interestingly explored by Hueston and colleagues [1].

Notably, these studies have used different cell types to explore intrinsic and extrinsic ADE properties. The FcγRIII-expressing K562 cell line does not produce type I interferon (IFN) and, thus, is not suitable for studying intrinsic ADE, as correctly pointed out by Hueston and colleagues [1]. Instead, this cell line has been widely used to measure extrinsic



**Figure 1.** Antibody-dependent enhancement of Zika virus (ZIKV) infection by dengue virus (DENV)-specific antibodies and levels of interleukin 6 (IL-6). FcγRIII-expressing K562 cells were infected with ZIKV PE/243 in the absence of antibodies or in the presence of a panel of serum samples from pregnant women with different dengue immune status, as determined by plaque reduction neutralization test: monotypic (DENV-3) ( $n = 10$ ) and multitypic (DENV-3 and DENV-4) ( $n = 10$ ). Cell culture supernatants were collected 48 hours postinfection, and levels of IL-6 were determined by cytometric bead array (BD CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit) following the manufacturer's instructions. Mann-Whitney test was used to determine statistical significance. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism software, version 7.0a.

ADE properties [2]. We acknowledge that measuring the production of inflammatory mediators—as suggested by Hueston et al—would be very informative. In fact, we observed no differences in interleukin 6 (IL-6) production between K562 cells infected with ZIKV in the absence of antibodies or in the presence of a panel of sera with different dengue immune profile (monotypic and multitypic) (Figure 1). In contrast, Hueston et al demonstrated increased IL-6 levels on human macrophages infected with ZIKV preincubated with dengue-immune sera [1]. These dissimilar findings probably reflect variations on the production of inflammatory mediators among different cell types under ADE conditions [2]. Of note, both experiments were based on a single short time point after infection (24 and 48 hours postinfection for Hueston et al and our experimental system, respectively); thus, a complete time course experiment after infection would probably represent a better picture of K562 cell inflammatory responses. However, investigating intrinsic ADE and expression of different cytokines was beyond the scope of our manuscript.

It is notable that considerable progress has been made in a short amount of time toward understanding the role of ADE of ZIKV infection by dengue antibodies. However, it remains necessary to determine the relevance of the ADE mechanism in the epidemiological context [9, 10], particularly by analyzing how previous dengue immunity affects virus transmission and the development of congenital ZIKV syndrome. Studies addressing this issue will have important implications for ZIKV and DENV vaccine development.

#### Notes

**Financial support.** This work was supported by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education; Center for Vaccine Research, University of

Pittsburgh; Fogarty Training Program (grant number D43TW006592 Pitt GIDRTP/ 323 NIH to P. M. S. C.); National Council for Scientific and Technological Development (grant number 482915/2010–2 MCT/CNPq-32114/2010); Strategic Program to Support Health Research/PAPES VI (grant number 322 407697/2012–8); and National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (grant number U19 AI56541).

**Potential conflicts of interest.** All authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

Priscila M. S. Castanha,<sup>1,2</sup>  
 Eduardo J. M. Nascimento,<sup>4,5</sup>  
 Cynthia Braga,<sup>1,3</sup>  
 Marli T. Cordeiro,<sup>1</sup>  
 Otávio V. de Carvalho,<sup>1</sup>  
 Leila R. de Mendonça,<sup>1</sup>  
 Elisa A. N. Azevedo,<sup>1</sup>  
 Rafael F. O. França,<sup>1</sup> Rafael Dhalia,<sup>1</sup>  
 and Ernesto T. A. Marques<sup>1,4,6</sup>

<sup>1</sup>Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), <sup>2</sup>Faculty of Medical Science/Institute of Biological Science, University of Pernambuco, and <sup>3</sup>Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, Recife, Brazil; and <sup>4</sup>Center for Vaccine Research and <sup>5</sup>Department of Infectious Disease and Microbiology, University of Pittsburgh, Pennsylvania

#### References

- Hueston L, Ramirez R, Mahalingam S. Enhancement of Zika infection by dengue virus-specific antibody is associated with low levels of antiviral factors. *J Infect Dis* 2017; 216:614–6.
- Halstead SB. Dengue antibody-dependent enhancement: knowns and unknowns. *Microbiol Spectr* 2014; 2. doi:10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014.

- Ng JK, Zhang SL, Tan HC, et al. First experimental in vivo model of enhanced dengue disease severity through maternally acquired heterotypic dengue antibodies. *PLoS Pathog* 2014; 10:e1004031.
- Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol* 2013; 158:1445–59.
- Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38:411–9.
- Castanha PMS, Nascimento EJM, Braga C, et al. Dengue virus-specific antibodies enhance Brazilian Zika virus infection. *J Infect Dis* 2017; 215:781–5.
- Bardina SV, Bunduc P, Tripathi S, et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting anti-flavivirus immunity. *Science* 2017; 356:175–80.
- Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwat W, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nat Immunol* 2016; 17:1102–8.
- Halstead SB. Biologic evidence required for Zika disease enhancement by dengue antibodies. *Emerg Infect Dis* 2017; 23:569–73.
- Mahalingam S, Tetzeira MM, Halstead SB. Zika enhancement: a reality check. *Lancet Infect Dis* 2017; 17:686–8.

Received 25 July 2017; editorial decision 17 July 2017; accepted 19 July 2017.

Correspondence: E. T. A. Marques Jr, MD, PhD, Center for Vaccine Research, 3501 Fith Ave, 3022 Biomedical Science Tower 3, Pittsburgh, PA 15261 (marques@pitt.edu).

*The Journal of Infectious Diseases*® 2017;216:914–9

© The Author 2017. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/infdis/jix046

# ANEXO C- THE TRANSCRIPTIONAL AND PROTEIN PROFILE FROM HUMAN INFECTED NEUROPROGENITOR CELLS IS STRONGLY CORRELATED TO ZIKA VIRUS MICROCEPHALY CYTOKINES PHENOTYPE EVIDENCING A PERSISTENT INFLAMMATION IN THE CNS



ORIGINAL RESEARCH  
published: 16 August 2019  
doi: 10.3389/fimmu.2019.01928



## The Transcriptional and Protein Profile From Human Infected Neuroprogenitor Cells Is Strongly Correlated to Zika Virus Microcephaly Cytokines Phenotype Evidencing a Persistent Inflammation in the CNS

### OPEN ACCESS

**Edited by:**  
Carl G. Feng,  
University of Sydney, Australia

**Reviewed by:**  
Melkuz Johannes Hölz,  
University of Sydney, Australia  
Sebastian Sifler,  
University of Zurich, Switzerland

**\*Correspondence:**  
Rafael F. O. Franca  
rafael.franca@cpqgm.fiocruz.br

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work

**Specialty section:**  
This article was submitted to  
Viral Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 23 May 2019  
**Accepted:** 30 July 2019  
**Published:** 16 August 2019

**Citation:**  
Lima MC, Mendonça LFd,  
Franca AM, Carrara RM,  
Anibal-Silva CE, Damers M, D'Aiuto J,  
Wood J, Chowdari KV, Griffiths M,  
Lucena-Araujo AR, Barral-Netto M,  
Azevedo EAN, Alves RW, Farias PCS,  
Marques ETA, Castanha PMS,  
Donald CL, Kohl A, Nimgaonkar V,  
and Franca RFO (2019) The  
Transcriptional and Protein Profile  
From Human Infected  
Neuroprogenitor Cells Is Strongly  
Correlated to Zika Virus Microcephaly  
Cytokines Phenotype Evidencing a  
Persistent Inflammation in the CNS.  
Front. Immunol. 10:1928.  
doi: 10.3389/fimmu.2019.01928

Morganna C. Lima<sup>1†</sup>, Laísa R. de Mendonça<sup>1†</sup>, Antonio M. Rozendo<sup>1†</sup>, Raquel M. Carrara<sup>2</sup>,  
Conceição E. Anibal-Silva<sup>1</sup>, Matthew Damers<sup>3</sup>, Leonardo D'Aiuto<sup>3</sup>, Joel Wood<sup>3</sup>,  
Kodavali V. Chowdari<sup>3</sup>, Michael Griffiths<sup>3</sup>, Antonio R. Lucena-Araujo<sup>4</sup>,  
Manoel Barral-Netto<sup>5</sup>, Elisa A. N. Azevedo<sup>1</sup>, Ronan W. Alves<sup>1</sup>, Pablo C. S. Farias<sup>1</sup>,  
Erasto T. A. Marques<sup>1,6</sup>, Priscila M. S. Castanha<sup>6</sup>, Claire L. Donald<sup>7</sup>, Alain Kohl<sup>7</sup>,  
Vishwajit L. Nimgaonkar<sup>3,8</sup> and Rafael F. O. Franca<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Oswaldo Cruz Foundation/Fiocruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Brazil, <sup>2</sup>Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom, <sup>3</sup>Department of Psychiatry, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, United States, <sup>4</sup>Federal University of Pernambuco/UFPE, Recife, Brazil, <sup>5</sup>Oswaldo Cruz Foundation/Fiocruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, Brazil, <sup>6</sup>Center for Vaccine Research, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, United States, <sup>7</sup>MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, Glasgow, United Kingdom, <sup>8</sup>Department of Human Genetics, Graduate School of Public Health, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, United States

Zika virus (ZIKV) infection during pregnancy is associated with microcephaly, a congenital malformation resulting from neuroinflammation and direct effects of virus replication on the developing central nervous system (CNS). However, the exact changes in the affected CNS remain unknown. Here, we show by transcriptome analysis (at 48 h post-infection) and multiplex immune profiling that human induced-neuroprogenitor stem cells (hNPCs) respond to ZIKV infection with a strong induction of type-I interferons (IFNs) and several type-I IFNs stimulated genes (ISGs), notably cytokines and the pro-apoptotic chemokines CXCL9 and CXCL10. By comparing the inflammatory profile induced by a ZIKV Brazilian strain with an ancestral strain isolated from Cambodia in 2010, we observed that the response magnitude differs among them. Compared to ZIKV/Cambodia, the experimental infection of hNPCs with ZIKV/Brazil resulted in a diminished induction of ISGs and lower induction of several cytokines (IFN- $\alpha$ , IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8, and IL-15), consequently favoring virus replication. From ZIKV-confirmed infant microcephaly cases, we detected a similar profile characterized by the presence of IFN- $\alpha$ , CXCL10, and CXCL9 in cerebrospinal fluid (CSF) samples collected after birth, evidencing a sustained CNS inflammation. Altogether, our data suggest that the CNS may be directly affected due to an unbalanced and chronic local inflammatory response, elicited by ZIKV infection, which contributes to damage to the fetal brain.

**Keywords:** Zika virus, central nervous system, inflammation, type-I interferon, interferonopathy, microcephaly, Zika congenital syndrome and cytokines

## INTRODUCTION

Congenital Zika Syndrome (CZS) comprise a wide spectrum of birth defects and symptoms observed in infants who have been exposed to Zika virus (ZIKV) during embryonic development (1). Although other minor abnormalities have been documented, the most dramatic symptoms are microcephaly, severe microcephaly, arthrogryposis, and ocular damage (2). Microcephaly is characterized as a developmental brain malformation that results in a cranial circumference  $<2$  standard deviations ( $2$ -SD) below the average for the same sex and gestational age, on the same way, severe microcephaly is classified based on a cranial circumference  $<3$ -SD below the average (3, 4). Microcephaly associated with ZIKV infection in pregnancy was first reported in Brazil in 2015 during a large outbreak of this virus (5). Initial associations between ZIKV infection and microcephaly development were based on the identification of viral RNA in fetal amniotic fluid (6) and in the brain tissue of fetuses and infants diagnosed with microcephaly (7, 8). Later, several reports from independent groups confirmed the association between ZIKV infection during pregnancy and congenital abnormalities (9).

Diagnosis of CZS is complex and involves several different steps, including taking head circumference measurements, neurological evaluation, radiologic brain imaging and ophthalmologic assessment. ZIKV exposure confirmation can be accomplished using molecular and serologic standard methods. However, since ZIKV is present in body fluids with different shedding kinetics, confirmation of virus infection remains challenging (10). In neonates presenting with signs of microcephaly, ZIKV infection can be confirmed by virus detection (i.e., RT-PCR) or by the presence of ZIKV-specific IgM in cerebrospinal fluid (CSF) or serum (4, 11). Importantly, the presence of anti-ZIKV IgM in the CSF of neonates with suspected CZS is a strong indicator of a recent congenital infection (12). Although significant improvements have been reached in terms of diagnosis, the exact pathogenic mechanisms related to ZIKV-induced microcephaly and others malformations remain largely unknown. Emerging evidence demonstrated that ZIKV infection impairs brain development by arresting cellular neurogenesis, leading to the deregulation of cell-cycle progression and apoptosis (13–16). Moreover, previous work has also assessed the birth defects resulting from ZIKV exposure in different pregnant mouse models (17–20). While most studies are focused on elucidating the specific cellular mechanisms of ZIKV pathogenesis through *in vitro* or *in vivo* models, the pathogenesis among naturally infected human subjects and its biological implications have not been investigated to the same extent.

In humans, the central nervous system (CNS) becomes to be established from 22 days onwards. Initially, the embryonic brain is entirely composed of highly proliferative neuronal progenitor cells (NPCs). Thus, at this stage, pathogenic processes induced by the unbalanced production and local secretion of immunoregulatory molecules may lead to reduced brain size, and consequently microcephaly (21). Therefore, investigations into ZIKV triggered immune responses, especially in the CNS, may

contribute to a better understanding of the disease mechanisms since specific immune mediators may play a major role in the pathogenesis of microcephaly. The finding that ZIKV infection leads to apoptosis in different neuronal models could also partially explain the cellular destruction observed in the radiological examination of neonates with CZS (22). On the other hand, the paracrine effects of cytokines and chemokines directly secreted in the CNS by the infected cells are still unknown. More recently, Tappe et al. (23) assessed cytokine kinetics in the serum of ZIKV infected patients. Despite the relatively small number of patients analyzed, the authors were able to compare samples from the acute and convalescent-phase, observing elevated levels of the chemokines CCL3, CCL4, CCL5 and CXCL10 during the recovery phase. During the acute phase, the authors observed a mixed cytokine pattern, with the increase of cytokines profiles associated with Th1, Th2, Th17, and Th9 CD4<sup>+</sup> T cell responses (23). In addition, it was reported that there were increased levels of CXCL10 and CCL2, IL-6, IL-8, VEGF, and G-CSF in the amniotic fluid of ZIKV-positive pregnant women with neonatal microcephaly (24). Furthermore, the overexpression of CXCL10 was recently identified as a potential serum biomarker of acute ZIKV infection (25). Taken together, these findings may suggest that ZIKV infection results in a specific pro-inflammatory profile. However, no reports from microcephaly cases were available so far, and it remains to be elucidated whether ZIKV-induced microcephaly could be associated with an organ-specific inflammation.

Here, we analyzed the transcriptional changes induced by ZIKV infection in human induced pluripotent neuroprogenitor stem cells (hiNPCs). We used this model to compare the pathogenesis of a contemporary South American strain (isolated in Brazil in 2015 at the peak of microcephaly cases) vs. an ancestral Asian strain isolated in Cambodia in 2010. Transcriptional data were further confirmed at protein expression levels and by assessing the levels of cytokines and chemokines in the CNS of confirmed ZIKV-induced microcephaly cases and validated through a second *in vitro* infection assay in human neuroblastoma cells. Our findings suggest an important role of type-I interferon (IFN) response and chemokines CXCL10 and CXCL9 in the pathogenesis of microcephaly, which may represent a still unaddressed target with the potential to interrupt the destructive CNS inflammation induced by ZIKV infection.

## METHODS

### hiNPCs Culture and Infection

Human induced neuroprogenitor cells (hiNPCs) derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), line 73-56010-02 sub-clone E, were grown on matrigel-coated, cell culture treated plates. Briefly, hiPSCs, were cultured with neuronal precursor selection medium, followed by neuronal precursor expansion medium (Thermo Fisher Scientific, Munich, Germany) containing fibroblast growth factor 2 (R&D Systems, Minnesota, USA) for the generation of neural stem cells. After 5–7 days in culture, neural rosettes were identified, manually dissected and plated into low-attachment plates where embryoid

body-like structures—denoted as neurospheres—emerged. Following the plating of neurospheres into the matrigel-coated plates, hiNPCs were collected manually for monolayer culture. hiNPCs were then cultured in neurobasal medium containing B27 (Thermo Fisher Scientific, Munich, Germany) supplement and brain-derived neurotrophic factor 10 ng/ml (R&D Systems, Minnesota, USA) for neuronal differentiation. hiNPCs cultured cells, passage 5, were grown until 85% confluent in 12-well plates and further infected at (multiplicity of infection) MOI 1 with a ZIKV Brazilian strain (ZIKV/*H.sapiens/Brazil/PE243/2015*, GenBank: KX197192.1), previously described (26) or a ZIKV Cambodian strain (Zika virus isolate Cambodia PSS13025/2010, GenBank: JN860885.1) prepared in Vero E6 cells, previously established in our laboratory. At 1-h post infection, the inoculation medium was removed and replaced with culture medium. At 48 h post infection, the cells were harvested and RNA was extracted for RNA-sequencing (RNA-Seq) and transcriptomic analysis.

### RNA-Seq and Data Analysis

RNA-Seq was performed at the Genomics Research Core, University of Pittsburgh, USA. Before sequencing, RNA quality was checked using the Agilent High Sensitivity RNA ScreenTape System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Whole-transcriptome sequencing was performed using the TruSeq Stranded Total RNA kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) with an average of 49.1 million reads per library. Each condition (infected and control samples) was sequenced in triplicate. The quality of sequenced reads was assessed by FastQC tool. Reads from each library were mapped against the human genome assembly GRCh38 with the annotation version 91 downloaded from the Ensembl database, applying the STAR aligner version 2.5.3. Later, R package DESeq2 was used to perform differential expression analysis (DEA). During this step, the biological replicates from infected and control samples were compared, but only genes presenting at least ten reads for all three biological replicates in at least one condition were considered for DEA. Genes with an absolute value of  $\log_2$  fold change equal to or  $>1$  and with a  $p$ -value, correct by the FDR approach, of  $<0.05$  were selected for functional analysis using the STRINGdb R package (<http://www.string-db.org>) and KEGG REST for pathway-based data integration (<https://www.kegg.jp/kegg/rest/>). The former was used to assign Gene Ontology (GO) (<http://geneontology.org/>) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway terms to differentially expressed genes (DEGs). In addition, the Biological Process ontology of GO was employed to perform a functional enrichment analysis for those genes. KEGG pathways were grouped into four categories (adaptive immune response, cytokine and chemokine signaling, interferon response, and cell death and growth) to visualize protein networks present in the STRING database. The protein networks built from the lists of DEGs were analyzed using Cytoscape software, version 3.6.0 (<https://cytoscape.org/>). Heatmaps were built using the gene counts normalized by the library size factors using the function heatmap of R environment. The mean of gene expression fold change from infected cell samples were plotted vs. the expression found in non-infected ones (Control) and visualized with ViaComplex software (27)

(<http://lifef.ufrgs.br/pub/biossoftwares/viacomplex>). For this analysis, we selected only the list of modulated genes identified in Figure 2A.

### Infection of Neuroblastoma Cells and Cytokine Analysis

Human undifferentiated neuroblastoma cells (cell line SH-SY5Y-ATCC® CRL-2266™) was cultured in 1:1 MEM and Ham's F12 Nutrient Mixture, supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mmol/L L-Glutamine, non-essential amino acids, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific) and 10% (v/v) fetal bovine serum in a humidified incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were infected with ZIKV/Brazil (ZIKV/*H.sapiens/Brazil/PE243/2015*, GenBank: KX197192.1) and analyzed at different days post-infection (dpi), as described on figure legends. Briefly, cells were harvested at 2 dpi and stained with anti-flavivirus envelope (E) protein primary antibody (4G2) and goat anti-mouse IgG secondary antibody conjugated with FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis MO), and analyzed by flow cytometry (FACS). Supernatants were harvested and processed for viral RNA extraction and qRT-PCR assays in several time points post-infection. In addition, supernatants were also harvested at 3 dpi and soluble cytokines and chemokines were quantified by the kit Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokine and Human Chemokine Kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

### Patients

Cases of microcephaly and other birth defects enclosing the CZS cases notified from 2015 to 2017 were investigated following a previously established protocol from the Brazilian Ministry of Health as follows: neonates with suspected microcephaly were investigated by measuring their head circumference. Those with a circumference of at least 2 SD below the mean for the same sex and gestational age on the Fenton growth chart were diagnosed with microcephaly. Severe microcephaly was diagnosed in those infants who presented with a head circumference smaller than 3 SD. Brain imaging was performed whenever possible. Control subjects were live neonates with suspected microcephaly at birth who had a CSF sample collected to perform ZIKV diagnosis, which were later classified as healthy through transfontanelar ultrasonography of the brain and which presented no other major birth defects. Exclusion criteria were anencephaly, encephalocele, and the confirmation of the phenotype of a well-defined congenital syndrome. Congenital infections, other than ZIKV, were assessed in infants and mothers from a blood sample collected right after birth by the STORCH laboratory-testing panel (congenital infections encompassing syphilis, toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus and herpes simplex virus). CSF samples from all neonate CZS suspected cases were collected by lumbar puncture, samples collected at a maximum of 4 weeks after birth were included in this study. For ZIKV infection confirmation, CSF samples were forwarded to the Arbovirus Reference Laboratory at the Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz/Recife, Brazil. ZIKV infection was diagnosed by detection of IgM antibodies or by ZIKV RNA presence determined by Real Time RT-PCR (rRT-PCR). ZIKV

exposure was confirmed based on a positive laboratory result from CSF and/or serum.

### Multiplex Immunoassays

Individual cytokines in all human neonate CSF samples were assayed in a Luminex Platform employing a commercially available kit: Cytokine Human Magnetic 25-Plex Panel (Thermo Fisher Scientific, Munich, Germany) following the manufacturer's instructions. hiNPC-derived infected supernatants were virus-inactivated by homogenizing samples in NP-40 at 0.2% and analyzed by the Human Cytokine 42-Plex Discovery Assay (Eve Technologies, Calgary, Canada). A complete list of the analyzed cytokines and chemokines and its detection limits are described in Supplementary Material (Tables S2, S3).

### Ethics Statement

Ethics protocol and procedures have been reviewed and approved by Institutional Ethics and Research Committee of the Instituto Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation-Fiocruz, Brazil (CAAE: 73669417.7.0000.5190). The hiNPC-based studies were approved by the University of Pittsburgh internal IRB and IBC.

### ZIKV ELISA IgM

ZIKV IgM antibodies were detected by MAC-ELISA (Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), employing an in-house protocol. Briefly, ZIKV antigen was prepared from ZIKV-infected Vero E6 cells. ELISA plates were sensitized with Goat anti-human-IgM (KPL/Sera Care, Milford, USA), before samples were added (1/400 dilution). Reactions were performed employing a detection antibody (MAB 6B6C-1/HRP), kindly provided by CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA). Serum and CSF samples were considered positive when the optical density exceeded 3.0 times that of the negative control.

### Virus Detection—Real-Time RT-PCR and Plaque Assays

Viral RNA was extracted manually from human serum and CSF samples using a QIAamp Viral RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. ZIKV Real Time RT-PCR (rRT-PCR) reactions were performed from purified RNA serum samples employing primers and probes as described by Lanciotti et al. (28). Briefly, reactions were performed in duplicate in a final volume of 20  $\mu$ l employing the kit GoTaq<sup>®</sup> Probe 1-Step RT-qPCR (Promega Corporation, Madison, USA), following manufacturer instructions. Cycling was performed using the QuantStudio 5 Real-Time system (Thermo Fisher Scientific) and samples with a Ct value <38 in duplicate wells were considered to be positive for ZIKV. For quantitative Real Time RT-PCR assays (RT-qPCR) a standard curve for ZIKV RNA copies was prepared from a previously titrated virus stock (range  $10^1$  to  $10^6$  PFU/mL). Plaque assays were performed on Vero E6 cells. Briefly, cells were seeded at a density of  $3 \times 10^5$  cells per well in standard 24 well plates and infected with serial dilutions of either cell culture supernatant from infected hiNPCs or virus stocks (for virus titration assays). After 2 h at 37°C the inoculum was

removed and the cells were washed with PBS. Then the cellular monolayers were overlaid with DMEM 2% containing 1.5% CMC (carboxymethyl cellulose). Five to seven days later, the wells were washed with PBS. Afterwards, the cells were fixed with 4% formaldehyde for 10 min and stained with 0.1% crystal violet for plaque visualization.

### Statistical Analysis

The Mann-Whitney unpaired test was used to compare continuous variables. Results were expressed as Tukey box-and-whisker plots showing median, upper and lower quartile, minimum, and maximum values. Outliers are represented by dots outside the 1.5 interquartile range of the 25 respective 75 percentile. All *p*-values were two sided with a significance level of 0.05. Calculations were performed using GraphPad Prism 7 software. Cytokines and chemokines data are represented by mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed by unpaired Student's *t*-test using the GraphPad 7 software.

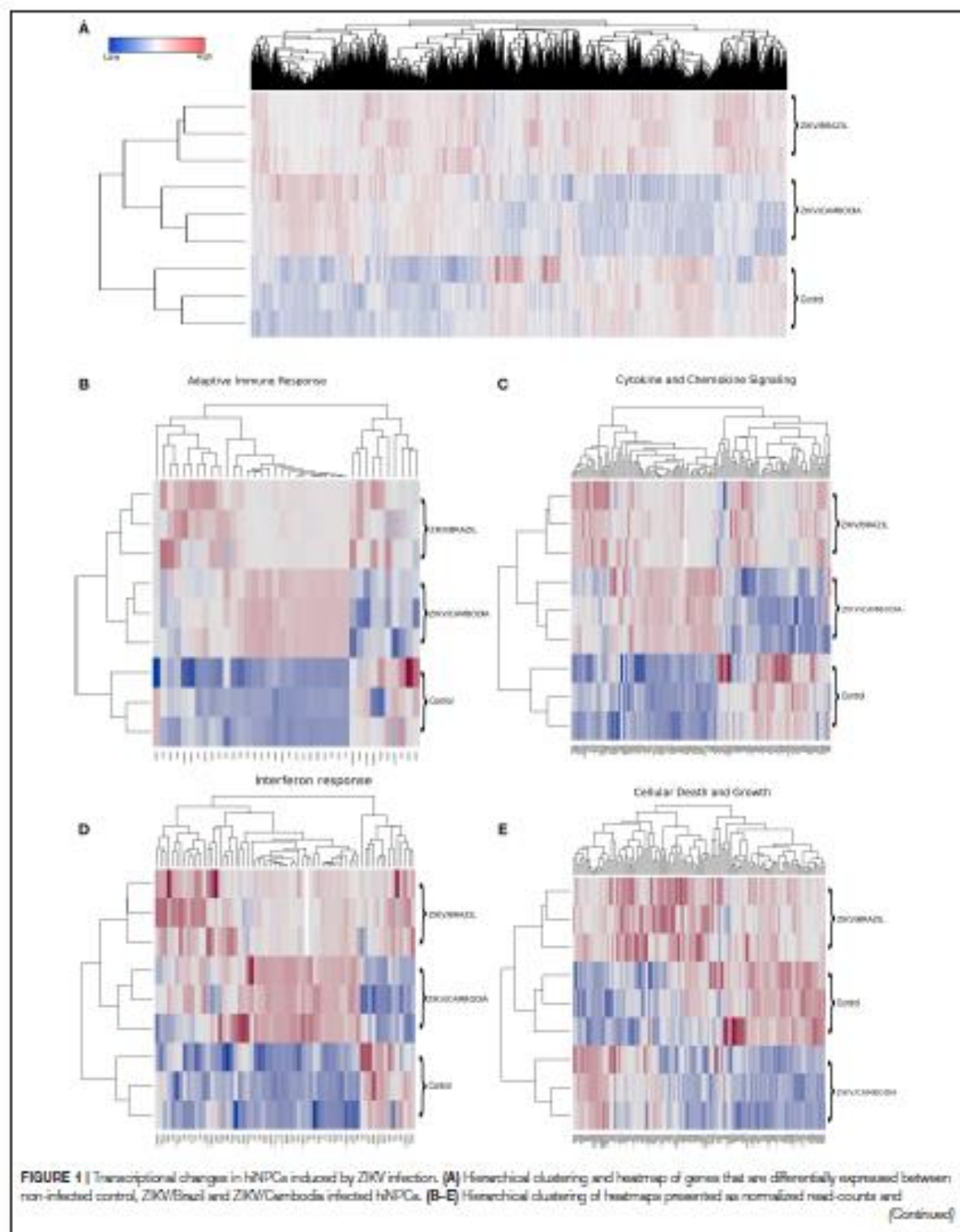
## RESULTS

### Transcriptional Changes in ZIKV-Infected hiNPCs

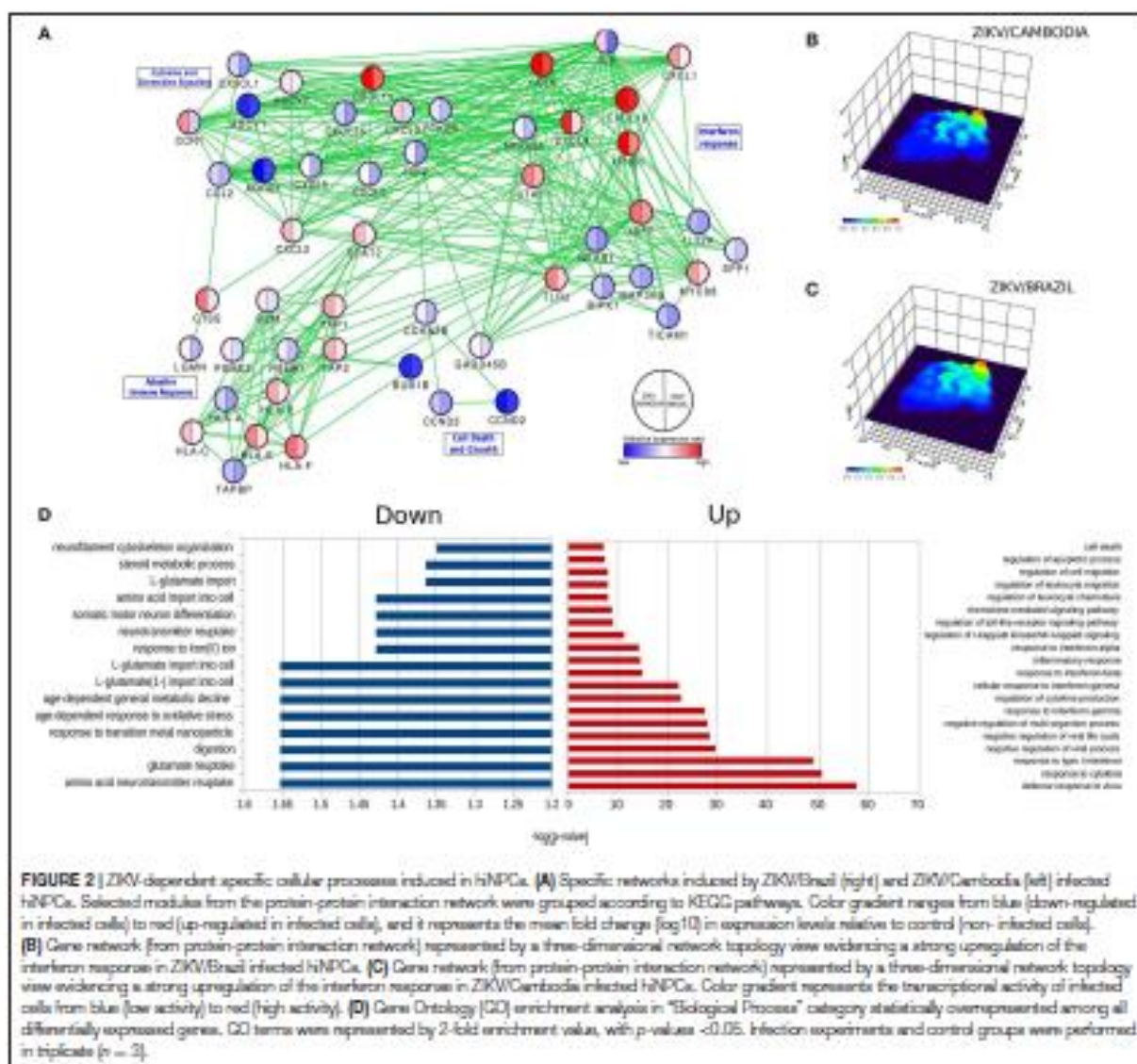
To identify the transcriptional profile that may account for the differentially activated host response during infection with a contemporary vs. an ancestral ZIKV Asian strain, here denominated ZIKV/Brazil and ZIKV/Cambodia, respectively, hiNPCs were infected, and after 48 h total RNA was extracted and analyzed using the Illumina NextSeq 550 sequencing platform. Figure 1A shows the global expression changes, represented by normalized RNA-Seq read counts among all the transcripts identified as significantly changed, only if the fold change ( $\log_2$ ) was  $>2$  (up or down) and the corrected *P*-value was less or equal than 0.05, in comparison to the control group. Overall, of all the identified genes, both strains induced profound transcriptional modifications. Thus, to better classify those genes that may account for the different immune response induced by both strains, we categorized these identified transcripts according to KEGG pathways. The clusters of differentially expressed genes that were either up or downregulated included several key cellular processes that were related to adaptive immune response, cytokine and chemokine signaling, interferon response, and cell death and growth (Figures 1B–E). Among the modulation on genes induced by both strains, we identified the upregulation of innate immune regulatory molecules, including several C-X-C motif chemokines, *STAT* genes, *MAPK* pathway, as well as transcripts for *TLR3*, *IRF7*, and other type-I IFN pathway-related genes. Adaptive immune response genes were also upregulated (Figure 1B). Comparative analysis of the transcriptional signature of infected hiNPCs demonstrated that ZIKV/Cambodia infection resulted in a higher modulation of specific gene clusters, including several C-X-C motif chemokines and type-I IFN response genes (Figures 1C,D). On the other hand, ZIKV/Brazil induced a more pronounced modulation of cell death and cell growth-related genes (Figure 1E).

Predictive network analysis suggested that a significant portion of the differentially up-regulated genes comprehends



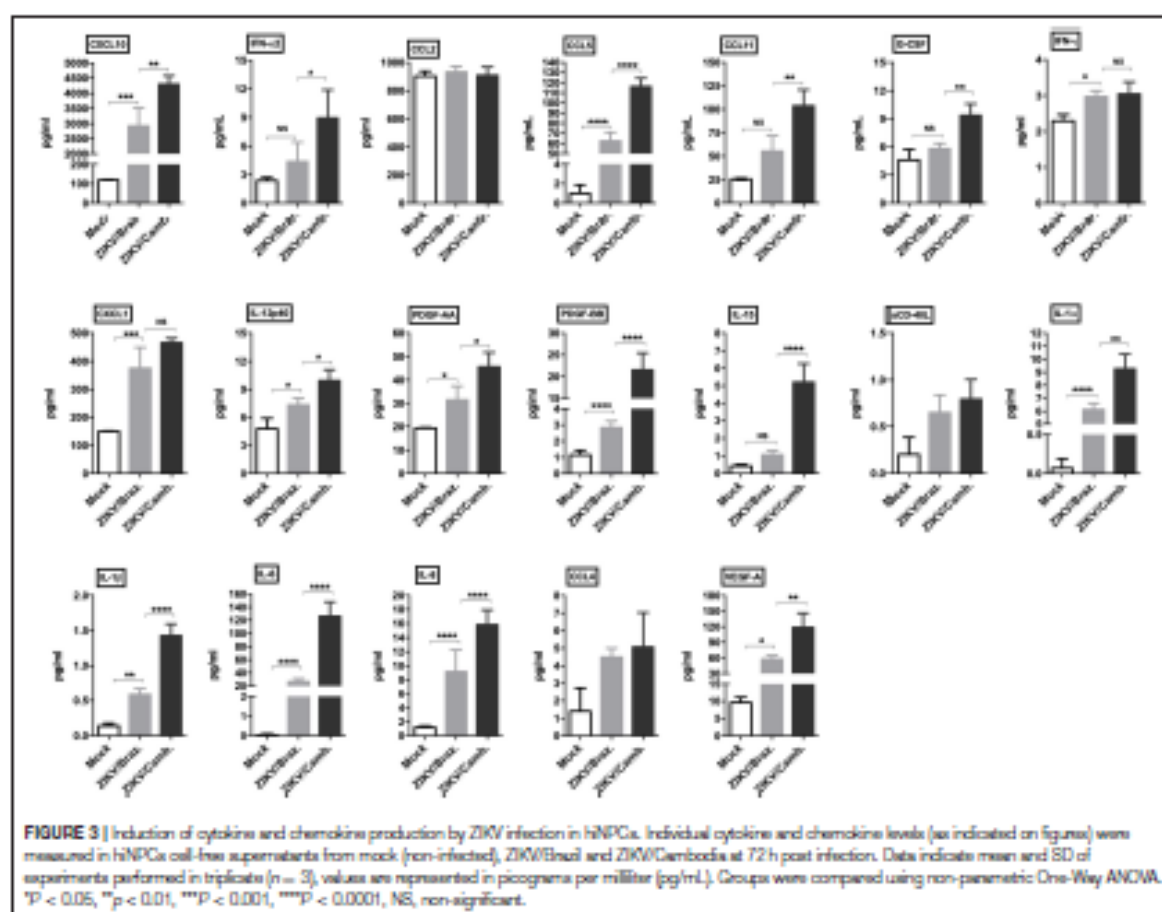


**FIGURE 1** | represented according to different groups of KEGG analyzed pathways. **(B)** Adaptive immune response. **(C)** Cytokines and chemokines signaling. **(D)** Interferon response. **(E)** Cell death and growth. Heatmaps are representative of all identified expressed transcripts, scale bar represents gene expression of normalized reads counts for each individual triplicate. Color gradient ranges from blue (low RNA-Seq read counts) to red (high RNA-Seq read counts). Single panel lines are representative of individual infection experiments as stated for ZIKV/Brazil, ZIKV/Cambodia and control group ( $n = 3$ ). Also see Figures S2–S4, which represent STRING functional protein networks analysis for the genes represented in the heatmaps.



a set of common pathways (Figure 2A and Figures S1–S4). Overall, the majority of genes that displayed a significant difference between control and infected cells were upregulated (Figure 2D). With regards to downregulated pathways, we observed changes mostly in genes related to metabolism and neurotransmitters (Figure 2D). Among all these processes there was a highly up-regulated notable gene cluster, the type-I

IFN response. This cluster includes transcripts for *IFNB1*, *STAT1*, *IRF3*, *IFNAR2*, *IRF7*, and *TLR3* (Figures 1D, 2D). Other transcripts were also detected at increased levels, including chemokine transcripts *CXCL9*, *CXCL10* (among the top-ranked expressed genes), *CXCL1*, and *CCL5*. The network of highly modulated genes was further analyzed with the ViaComplex software, which compared the transcriptional profile of infected



vs. uninfected cells plotting the mean expression values (Z-axis) as a 3D landscape topographical view, this analysis showed the cluster of type-I IFN response as the highest level of expression induced by infection (Figures 2B,C). In general, both strains were able to upregulate the type-I IFN response, however, we found that ZIKV/Cambodia induced a more robust modulation. Together, these results suggest that the ZIKV induced transcriptional changes are, at least in part, strain dependent.

To confirm this inflammatory transcriptional profile we quantified the concentration of cytokines, chemokines and growth factors in hiNPCs supernatants through a multiplex assay, which included several soluble markers. We compared the levels of these markers induced after infection by both strains in a single time point (72 hpi). We observed a strong significant modulation of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, and IL-8, and the chemokines CCL5, CXCL10, and CXCL11, induced by both strains. ZIKV/Cambodia induced significantly higher levels of IFN- $\alpha$ 2, compared to ZIKV/Brazil infected hiNPCs. Also, ZIKV/Cambodia infection was associated

with significantly enhanced levels of CXCL10, CCL5, CCL11 and the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8, IL-15, IL-12p40, and IL-1 $\alpha/\beta$  (Figure 3). Overall, inflammatory markers assessed by this analysis correlated with the transcriptional profiles in infected hiNPCs.

To further explore if the enhanced inflammatory activity from ZIKV/Cambodia infected cells was associated with a difference in virus replication, we quantified the average reads depth of the ZIKV genome from infected and non-infected hiNPCs. As expected, no ZIKV genome reads were observed in the control group (Figure 4A). However, nearly complete ZIKV genomes were recovered from infected hiNPCs, with a high coverage from both strains (coverage above 99.9%). NGS results demonstrated that ZIKV/Cambodia gave a much lower read counts average (depth below 10,000) compared to ZIKV/Brazil infected cells (depth above 10,000) (Figures 4B,C). Albeit lower, ZIKV/Cambodia sequencing depth RNA levels, were not correlated to a significant increased viral load (infectious particles) in infected hiNPCs supernatants, analyzed at 48 hpi (Figure 4D). Thus, despite the minor differences in

virus replication, it is suggestive that the magnitude of the inflammatory response may interfere with the viral titers, though key pathways are activated regardless of the virus strain.

### ZIKV Infection of Human Neuroblastoma Cells Also Induce Chemokines Release

Given the ability of ZIKV infection to up-regulate chemokines and cytokines transcripts in hiNPCs, we determined the susceptibility of a distinct neuronal cell line. For this, we opted to evaluate the feasibility of human neuroblastoma cells (SH-SY5Y cells) to respond to ZIKV infection by increasing cytokines/chemokines production. First, to confirm infection, undifferentiated SH-SY5Y cells were infected and analyzed by FACS at 2 dpi, positive viral envelope protein (E) staining was observed in a large percentage (65.1%) of the infected cells (Figure 5A) and viral RNA, detected in the supernatant, increased over time (Figure 5B), confirming that these cells were susceptible to infection. Next, we evaluated the presence of a set of cytokines and chemokines in the supernatants using two different sets of human CBA assays. The results show increased production of IL-8, CXCL10, CCL2, CCL5, and IL-6 (Figure 5C) at 3 dpi, indicating the ability to induce an active pro-inflammatory response. No other cytokines were detected at significantly increased levels (data not shown). Infection also results in enhanced expression of several IFN stimulated genes, especially *IFNA1*, *IFNB1*, and *TLR3* transcripts (Figure 5D).

### CNS Inflammatory Profile of ZIKV Confirmed Microcephaly Cases

The increased type-I IFN and chemokine responses observed from ZIKV infection are common features of viral infections including ZIKV, however, in the CNS, a hyperactivation or a sustained inflammatory process may result in extensive tissue damage, especially in the context of a developing brain. Thus, to better characterize the ZIKV inflammatory profile we assessed the CNS immune profile of confirmed ZIKV-induced microcephaly and severe microcephaly human cases (here, collectively denominated "microcephaly"). From a total 2,334 CZS suspected cases from September 2015 to May 2016 in Northeastern Brazil, we were able to identify 27 healthy control patients (no brain alterations) and 51 cases of microcephaly, based on clinical diagnosis, with CSF sample availability (characterized by a previous collected sample stored at the laboratory). Among the microcephaly cases included in our study, 40 (78.4%) were diagnosed as severe microcephaly (head circumference <3 SD on the Fenton growth chart) and 11 as microcephaly (head circumference <2 SD). Complete information and patient characteristics and laboratory results are summarized in Table 1. Additional laboratory data are summarized in Table S1 and Supplementary Material. ZIKV infection was diagnosed by the presence of anti-ZIKV IgM in the CSF in all of the 51 confirmed microcephaly cases. Among these 51 cases, the presence of ZIKV RNA (rRT-PCR) was identified in only two samples (Table S1). Importantly, no positive anti-ZIKV IgM or rRT-PCR CSF samples were observed in the healthy control group. STORCH testing for

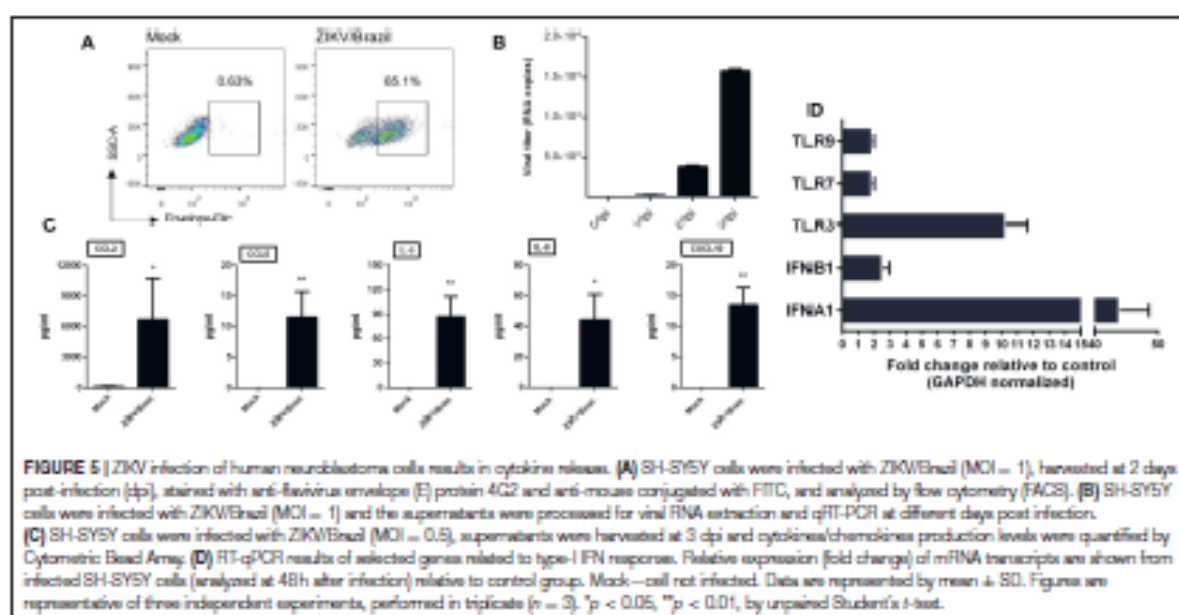
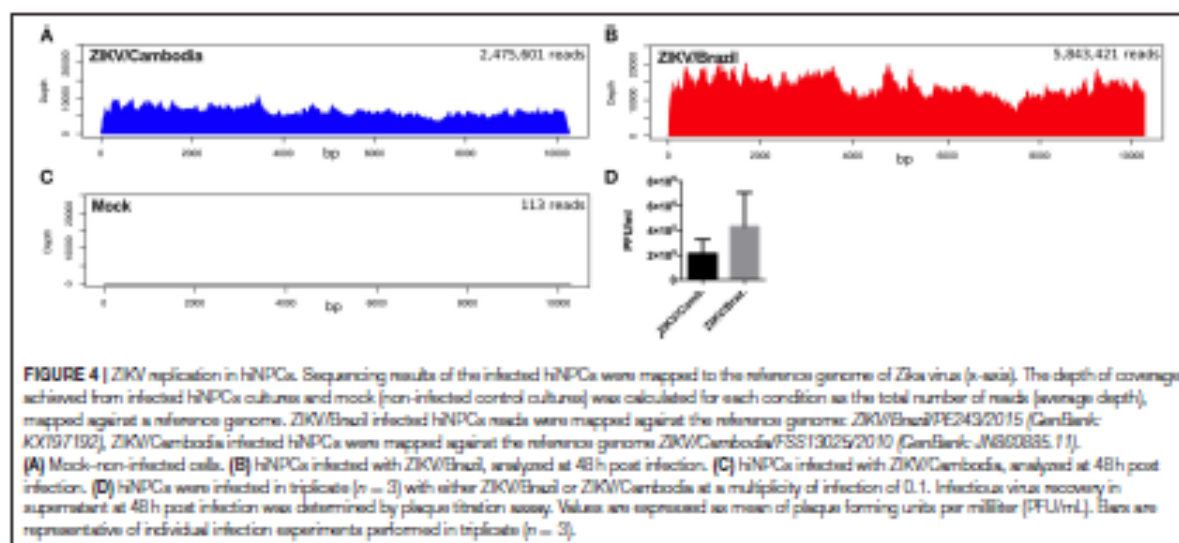
TABLE 1 | Characteristics of patients included in the study.

	Healthy control	Microcephaly
<b>Neonates, total number of subjects (%)</b>	<b>27 subjects</b>	<b>51 patients</b>
Male	10 (37)	22 (43)
Female	17 (63)	29 (57)
<b>Gestational age at birth, (%)</b>		
Pre-term	5 (18.5)	5 (9.8)
Term	21 (77.3)	44 (86.2)
Post-term	1 (3.7)	2 (4)
<b>Birth weight, grams (%)</b>		
>2,500g	19 (70.4)	39 (76.5)
>1,500-2,499.9g	8 (29.6)	10 (19.6)
<1,500g	0	1 (1.96)
Not informed	0	1 (1.96)
<b>Head circumference (%)</b>		
Normal	27 (100)	0
<2 SD (microcephaly)	0	11 (21.6)
<3 SD (severe microcephaly)	0	40 (78.4)
<b>Mothers (total number of subjects)</b>	<b>27</b>	<b>51</b>
<b>Reported rash during pregnancy (%)</b>		
No rash	26 (96.3)	35 (68.6)
First trimester	0	9 (17.6)
Second trimester	1 (3.7)	1 (1.96)
Third trimester	0	3 (5.9)
Yes, unknown period	0	3 (5.9)

A total of 27 neonates with a discordant diagnosis of microcephaly (healthy controls) were included in this study. Among the confirmed microcephaly and severe microcephaly cases, a total of 51 neonates, which had CSF samples available, were included for further cytokine investigation. All of the neonates had CSF samples collected no later than 4 weeks after birth.

common congenital infections was performed for all subjects, and no IgM reactive samples were documented (Table S1 and Supplementary Material). Based on this, other congenital common infections were ruled out, and the final diagnosis was microcephaly associated with maternal ZIKV infection.

CSF samples from healthy control subjects and microcephaly neonate cases were analyzed employing a panel of 25 different human cytokines and chemokines. Through our analysis, microcephaly-associated CSF samples showed significantly higher levels of IFN- $\alpha$  ( $p = 0.0428$ ), compared to the control group. Albeit slightly higher, there was no significant difference in the levels of IL-1 $\beta$  and IL-1RA ( $p = 0.054$  and  $p = 0.10$ , respectively). The pro-inflammatory cytokines IFN- $\gamma$ , IL-6, and IL-8 were similar between the groups. Among chemokines, we did not observe a significant difference in the levels of CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, and CCL11. Interestingly, consistent with the *in vitro* results, two CXC chemokine ligands were found at significantly higher levels in the CSF samples from microcephaly cases: CXCL9 and CXCL10 ( $p = 0.028$ , and  $p = 0.0003$ , respectively). Among T-cell activation related cytokines, we did not observe a cytokine signature associated with a predominant

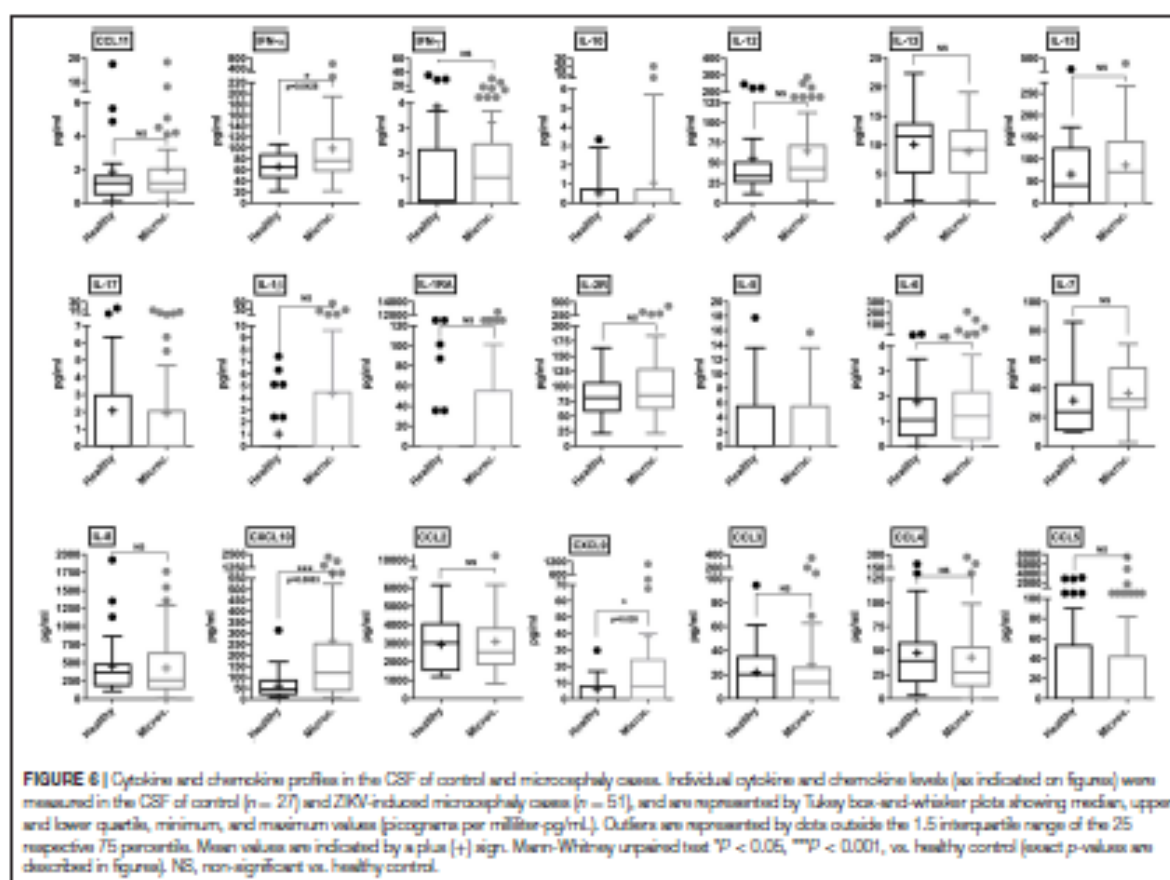


helper T-cell response. We also observed no difference in IL-5, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, and interleukin-2 receptor (IL-2R) production between microcephaly cases compared to the control group (Figure 6). Four cytokines (GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-2, and IL-4) were below the detection limit (data not shown). Altogether, these observations show that the transcriptional changes induced by ZIKV infection results in respective protein levels increase *in vitro* and that this inflammatory signature is also present in the CNS of ZIKV-induced microcephaly cases. Moreover, our data suggest that children suffering

from ZIKV-induced microcephaly may experience long-term or chronic neuroinflammation.

## DISCUSSION

Currently, the underlying pathophysiological mechanisms of ZIKV-induced microcephaly and CZS remain poorly understood. It has been documented that ZIKV infection leads to a reduction in NPCs numbers as a result of apoptosis (29), cell cycle arrest (30), and premature differentiation (31),



consequently impairing neuronal development. Although NPCs are the main targets of ZIKV replication effects, infection in isolated cell models are frequently underexplored regarding inflammatory responses (32). Here, we employed different approaches to better characterize the CNS inflammatory response induced by ZIKV infection. First, through the use of hiNPCs, we observed a strain-dependent modulation of host genes, including the induction of several ISGs. Next, we confirmed that experimental infection of hiNPCs leads to extensive chemokine and cytokine release, consistent with the induced transcriptional profile. Since the manipulation of stem cells may result in differentiation variability between distinct cell lines, laboratories and in variations in differentiation efficiency (33), we opted to include a second cell line to model ZIKV infection. Human neuroblastoma cells have the advantage of being inexpensive, consistent and reproducible neuronal cell model (34). These cells supported a productive ZIKV replication cycle, with a similar inflammatory profile. However, an important finding from our work is that the *ex vivo* profiling of the CNS inflammation in ZIKV-induced microcephaly infants supports our *in vitro* experimental data.

As reported by others, the inflammatory response elicited by ZIKV is strain-dependent, where African induces a much higher inflammatory response than Asian strains (35). Additionally, African strains are less effective in inhibiting type-I IFN responses (36). In our model, we found a specific signature induced by ZIKV/Brazil, a previously characterized South American strain (26). Importantly, this virus was isolated from a highly endemic area (northeastern Brazil), concomitantly at the peak of microcephaly cases in 2015. Thus, we can assume that ZIKV/Brazil represents a virus strain-specificity (same strain circulating during the initial microcephaly outbreak). Evidently, infection with both strains led to an inflammatory immune response in hiNPCs, however differences in the magnitude of inflammatory cytokines were found to be strain-specific, which may help to explain why a higher incidence of microcephaly was first observed in northeastern Brazil. A reasonable explanation is that the lower magnitude of inflammation induced by the innate immune responses may inefficiently limit viral replication, since the reduced type-I IFN response may result in augmented higher viral burden or chronification of the infection. Interestingly, as reported by others, ZIKV Brazilian strains share characteristics of viruses that do not induce a robust innate immune activation

(37), which may render these strains more effective at establishing a persistent infection or increased capacity to cross the placenta and/or to invade the CNS. Here, although ZIKV RNA levels were significantly lower in ZIKV/Cambodia compared to ZIKV/Brazil infected hiNPCs, we observed only a slight difference in the presence of infectious virus at 48 hpi, and thus a complete virus growth curve would be more enlightening. Therefore, our results contribute to a better understanding of ZIKV immunopathological processes, and they are in agreement with a previous report where an American strain of ZIKV results in an enhanced viral load and a more severe microcephaly phenotype in mice (38). Importantly, as demonstrated in an independent study, a distinct ZIKV Brazilian strain showed a delayed production of infectious virus *in vitro*. By comparing ZIKV/Cambodia to ZIKV Brazil Fortaleza (GenBank: *KX811222*) the authors found that ZIKV/Brazil reached a virus production peak at a later time point (72 h), whereas in early times this difference was not so evident (37).

Through the transcriptional profile analysis and multiplex immunoassays, we identified key major cellular signaling pathways and inflammatory markers. Transcriptomic data of experimentally ZIKV infected cells have been generated by several independent groups (39–41), however, given the large variability of the cell lines employed, time of infection, virus strains and amount of infectious particles on each approach, combinatory analysis of such data becomes challenging. We demonstrated that IFN- $\alpha$ , CXCL10, and CXCL9 levels were significantly higher in CSF samples obtained from ZIKV-induced microcephaly cases, compared to healthy control subjects. It is important to note that all CSF sampling was performed right after birth, up to a maximum of 4 weeks of life, ensuring that the presence of soluble immune mediators is representative of a sustained inflammatory process. High variation in expression levels of a few cytokines (notably IL-1 $\beta$  and IL-1RA) was observed, potentially demonstrating that we missed the detection of specific perturbations as the result of a single time point sampling (after birth). Also, several cytokines were below the detection limit, indicating their low levels of expression in the CSF. We could not predict exactly when the infection occurred, which may explain some of the variations observed. However, even though the virus was not detected in most of the subjects analyzed, as illustrated by the large proportion of rRT-PCR negative CSF samples, we can assume that the resulting inflammation is persistent.

Remarkably, several different congenital infections lead to a common clinical presentation, collectively denominated TORCH (Toxoplasmosis, Other, Rubella, Cytomegalovirus, and Herpes) these congenital infections also result in microcephaly and cerebral calcifications. Overall, these pathogens are highly neurotropic, but first, they must cross the placenta to induce fetal damage (42). Currently, it remains unclear how ZIKV can reach the fetal compartment, as well as the exact fetal tissues targeted. Albeit ZIKV antigens and viral RNA were detected almost exclusively in the brains of infants and fetuses with microcephaly (7, 8, 43) no descriptions regarding the neural tissue inflammation has been reported. Interestingly, Aicardi-Goutières syndrome (AGS) resembles the clinical findings

of ZIKV-induced microcephaly. AGS patients present brain calcifications, changes in white matter, cerebral atrophy and the laboratory findings include increased levels of IFN- $\alpha$  in the CSF (44). Mechanistically, AGS patients have been classified in the group of type-I interferonopathies, which comprise a group of genetic (Mendelian) disorders caused by a sustained type-I IFN response during the embryonic development. Experimentally, the chronic exposure of astrocytes to high levels of IFN- $\alpha$  resulted in reduced cell proliferation, increase in antigen-presenting genes and down-regulation of pro-angiogenic factors (45). Besides, the transgenic expression of IFN- $\alpha$  in the CNS of mice induces inflammation and neurodegeneration, similar to that seen in AGS (46–48). Based on this we can assume that the sustained levels of type-I IFN, here described, may play a role in ZIKV-induced microcephaly contributing to the induction of detrimental developmental effects.

Recently published reports from animal models, which explored the effects of ZIKV during pregnancy, required the blockade of type-I IFNs to achieve susceptible hosts (19, 49). Thus, the absence of type-I IFN signaling in ZIKV animal experiments lacks an important component in studies related to ZIKV immunopathogenesis. In agreement with our data, the induction of type-I IFN signaling, as a result of ZIKV infection in mice, led to increased apoptosis in the placental labyrinth, abnormal maternal-fetal barrier, and fetal hypoxia. Moreover, type-I IFN treatment of human midgestation villous explants led to abnormal villous structures, which are strongly associated with growth restriction and spontaneous abortions (50). Albeit of great relevance, the authors explored the effects of type-I IFNs exclusively on the developing placenta. Here, we propose that type-I IFNs may play an important role in developmental defects caused by ZIKV, specifically in the context of brain damage, as a result of chronic local inflammation.

As reported, ZIKV non-structural proteins are effective in inhibiting type-I IFN, which favors virus replication and may lead to viral persistence in different body compartments (51–53). In fact, recent reports describe ZIKV persistence in infants (54, 55) and adults (56). Here, we hypothesize that peripheral type-I IFN inhibition is an essential step that facilitates CNS invasion. Once in the CNS, the virus induces a sustained, suboptimal type-I IFN response that leads to extensive neuroinflammation and tissue injury. Interestingly, activation of type-I IFN signaling in brain endothelial and epithelial barriers results in CXCL10 release into the brain parenchyma and this signaling cascade was recently correlated to “sickness behavior,” a common set of symptoms due to viral infections (57). Of note, CXCL10 and CXCL9 can be induced by both, type-II (IFN- $\gamma$ ) and type-I IFNs (58). Increased levels of IFN- $\alpha$  and CXCL10 in the CSF of AGS patients were already documented, and these findings were associated with the absence of IFN- $\gamma$  (59). Mechanistically, CXCL9 and CXCL10 bind to CXCR3, a receptor primarily expressed on T cells and NK cells (60) also found in NPCs (61). Among other effects, CXCL10 treated neurons developed increased membrane permeability, which was followed by caspase-3 dependent apoptosis (62). In fact, ZIKV infection leads to extensive caspase-3 activation in different animal and *in vitro* models (19, 29, 63, 64). This correlation becomes

more apparent considering that IFN- $\alpha/\beta$  treatment leads to enhanced calcification of cultured human vascular smooth muscle cells (65), indicating that IFN- $\alpha$  promotes the generation of calcium deposits and supports the proposition that IFN- $\alpha$  acts directly on ZIKV-induced microcephaly calcifications, a frequently reported clinical finding. Thus, we suggest that in the CNS, induction of IFN- $\alpha$  by ZIKV infection acts to further up-regulate the local chemokine response and consequently, apoptosis. On the other hand, direct IFN-independent induction of CXCL10 has been documented for different RNA viruses (66–68). Interestingly, CXCL10 elicits apoptosis in fetal neurons, dependent on intracellular Ca(2+) increase and caspase-3 activation (69). Based on this, we propose a model in which these inflammatory mediators act synergistically contributing to most of the alterations observed in microcephaly cases. To our knowledge, we are the first to demonstrate a more detailed neuroinflammation profile from human cases of ZIKV-induced microcephaly. Collectively, our data corroborate other independent findings that implicate type-I IFNs as a potential modulating factor in ZIKV-associated pregnancy complications.

## DATA AVAILABILITY

RNA-Seq data are available at NCBI BioProject under accession number PRJNA551246. Data supporting this study can be found at **Supplementary Files**. A complete description of methods can be requested from the corresponding author, further information supporting this study can also be made available.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

ML and RC performed the sample processing, Luminex assays, and analysis. MI, EA, RA, PE, PC, and CA-S contributed to the sample classification and laboratory diagnosis. LM performed the SH-SY5Y cells infection experiments, FACS, qRT-PCR analysis, and Luminex assays. MD, L'D'A, KC, and JW performed the hiNPCs infection experiments and RNA-Seq assay. AR performed the RNA-Seq and transcriptomics analysis.

## REFERENCES

- Miranda-Filho D de B, Martelli CMT, Ximenes RA de A, Araújo TVB, Rocha MAW, Barros BCE, et al. Initial description of the presumed congenital Zika syndrome. *Am J Public Health*. (2016) 106:598–600. doi: 10.2105/AJPH.2016.305115
- Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pearson A, Ventura CV, Fonseca EB da, et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital Zika syndrome for pediatric clinicians. *JAMA Pediatr*. (2017) 171:288–95. doi: 10.1001/jamapediatrics.2016.3982
- de Araújo TVB, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, de Barros Miranda-Filho D, Montarroyos UR, de Melo AP, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*. (2016) 16:1356–63. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30318-8
- de Araújo TVB, Ximenes RA de A, Miranda-Filho D de B, Souza WV, Montarroyos UR, de Melo AP, et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil

PC performed the virus quantification assay. AL-A, MG, and RF performed the statistical analysis of cytokines and chemokines profile in human samples. EM, AL-A, RE, CD, AK, VN, and MB-N contributed to the data interpretation and discussion. RF conceived the study, supervised the study, and wrote the manuscript. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

## FUNDING

The research leading to these results received funding from the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco/FACEPE, grant agreement nos. APQ-0055.2.11/16 and APQ-0044.2.11/16, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq grant agreement 439975/2016-6 under RF coordination and responsibility. UK Medical Research Council Grants MC\_UU\_12014/8 and MR/N017552/1 under AK's coordination. VN received grant support from the Stanley Medical Research Institute (07R-1712), National Institutes of Health (MH63480 and D43 TW009114) and Cura Zika—University of Pittsburgh. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Fiocruz Luminex Platform (Subunidade Luminex-RPT03C Rede de Plataformas PDTIS, FIOCRUZ/RJ) for the use of its Luminex facilities. We also thanks Dr. Akiko Iwasaki from Howard Hughes Medical Institute, Yale School of Medicine, for her generosity on cytokines multiplex assays.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01928/full#supplementary-material>

- final report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*. (2018) 18:528–36. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30727-2
- Faria NR, Azevedo RDSDS, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. *Science*. (2016) 352:545–9. doi: 10.1126/science.1250566
- Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*. (2016) 16:653–60. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00095-5
- Mlakar I, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljnak-Prijatelj M, Mraz I, et al. Zika virus associated with microcephaly. *New Engl J Med*. (2016) 374:951–8. doi: 10.1056/NEJMoa1600651
- Driggers RW, Ho C-Y, Korhonen EM, Kaivainen S, Itäskeltainen AI, Suvara T, et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. *New Engl J Med*. (2016) 374:2142–51. doi: 10.1056/NEJMoa1601824
- Petersen LJ, Jamieson DJ, Powers AM, Henslin MA. Zika virus. *New Engl J Med*. (2016) 374:1552–63. doi: 10.1056/NEJMoa1602113



10. Pax-Halley G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika virus in body fluids—final report. *New Engl J Med*. (2018) 379:1234–43. doi: 10.1056/NEJMoa1613108
11. Lanasar HM, Stringer EM, de Silva AM. The emerging Zika virus epidemic in the Americas: research priorities. *JAMA*. (2016) 315:1945–6. doi: 10.1001/jama.2016.2899
12. Cordeiro MT, Pena LJ, Brito CA, Gil LH, Marques ET. Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. *Lancet*. (2016) 387:1811–2. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30253-7
13. Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo S-S, Lee S-A, et al. Zika virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR signaling in human fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. *Cell Stem Cell*. (2016) 19:663–71. doi: 10.1016/j.stem.2016.07.009
14. Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell*. (2016) 19:672. doi: 10.1016/j.stem.2016.10.017
15. Gouvea PP, Leisola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade F, Delucchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. (2016) 352:816–8. doi: 10.1126/science.1251793
16. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell*. (2016) 18:587–90. doi: 10.1016/j.stem.2016.02.016
17. Cugala FR, Fernandes IR, Basso FR, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. (2016) 534:267–71. doi: 10.1038/nature18296
18. Lanasar HM, Gouvea I, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, et al. A mouse model of Zika virus pathogenesis. *Cell Host Microbe*. (2016) 19:720–30. doi: 10.1016/j.chom.2016.05.010
19. Miner JJ, Cao B, Gouvea I, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell*. (2016) 165:1081–91. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.008
20. Brown JA, Singh G, Acklin JA, Lee S, Dachtel JE, Chokola AN, et al. Dengue Virus Immunity Increases Zika Virus-Induced Damage during Pregnancy. *Immunity*. (2019) 50:751–62.e5. doi: 10.1016/j.imm.2019.01.011
21. Devakumar D, Bamford A, Ferreira MU, Broad J, Rouch RE, Groce N, et al. Infectious causes of microcephaly: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Infect Dis*. (2018) 18:e1–3. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30398-5
22. Hain AN, Perotti A, Di Cavalcanti Souza Cruz D, Tenorio M, van der Linden A, Pena LJ, et al. Computed tomographic findings in microcephaly associated with Zika Virus. *New Engl J Med*. (2016) 374:2193–5. doi: 10.1056/NEJM.1603617
23. Tappe D, Pérez-Girón JV, Zammarini L, Risøland I, Ferreira DF, Iamchik T, et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med Microbiol Immunol*. (2016) 205:269–75. doi: 10.1007/s00430-015-0445-7
24. Orndorf AMM, Ponzato P, Silveira PP, Melo FO, Ferreira TA, Oliveira-Saizfeld PS, et al. Immune activation in amniotic fluid from Zika virus-associated microcephaly. *Ann Neurol*. (2017) 81:152–6. doi: 10.1002/ana.24839
25. Navica PG, Pontes GS, Chang AY, Silva GAVD, Nascimento VAD, Monteiro DCDS, et al. Analysis of the immunological biomarker profile during acute Zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. *Memorias do Inst Oswaldo Cruz*. (2018) 113:e170542. doi: 10.1590/0074-02760170542
26. Donald CL, Brennan B, Camborworth SL, Bendy VV, Clark II, Cordiero MT, et al. Full genome sequence and sRNA-interferon antagonist activity of Zika virus from Recife, Brazil. *PLoS Neglected Trop Dis*. (2016) 10:e0005048. doi: 10.1371/journal.pntd.0005048
27. Costo MAA, Filho ILR, Dalmeida RS, Sinigaglia M, Moreira KCF, Mombach JCM, et al. VisComplex: software for landscape analysis of gene expression networks in genomic context. *Bioinformatics*. (2009) 25:1468–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btp246
28. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven J, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. (2008) 14:1232–9. doi: 10.3201/eid1408.080287
29. Souza BSF, Sampaio GLA, Pereira CS, Campos GS, Sardi SI, Freitas LAR, et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Sci Rep*. (2016) 6:29775. doi: 10.1038/srep29775
30. Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell*. (2016) 19:120–6. doi: 10.1016/j.stem.2016.04.017
31. Gabriel E, Ramani A, Karow U, Gottardo M, Natarajan K, Gooi LM, et al. Recent Zika virus isolates induce premature differentiation of neural progenitors in human brain organoids. *Cell Stem Cell*. (2017) 20:397–406.e5. doi: 10.1016/j.stem.2016.12.005
32. Hanners NW, Eison JL, Usui N, Richardson RR, Wexler EM, Konopka G, et al. Western Zika virus in human fetal neural progenitors persists long term with partial cytopathic and limited immunogenic effects. *Cell Rep*. (2016) 15:2315–22. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.075
33. Hu B-Y, Weick JP, Yu J, Ma L-X, Zhang X-Q, Thomson JA, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2010) 107:8335–40. doi: 10.1073/pnas.0910012107
34. Shipley MM, Mangold CA, Sepers ML. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J Vis Exp*. (2016) 2016:53193. doi: 10.3791/53193
35. Tripathi S, Balasubramanian VRMT, Brown JA, Mena I, Grant A, Bardina SV, et al. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. *PLoS Pathog*. (2017) 13:e1006258. doi: 10.1371/journal.ppat.1006258
36. Foo S-S, Chen W, Chan Y, Bowman JW, Chang L-C, Choi Y, et al. Asian Zika virus strains target CD14 blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nat Microbiol*. (2017) 2:1558–70. doi: 10.1038/nm1564-017-0016-3
37. Esser-Nobis K, Aarberg LD, Roby JA, Fairgrieve MR, Green R, Gale M Jr. Comparative analysis of African and Asian lineage-derived Zika virus strains reveals differences in activation of and sensitivity to antiviral innate immunity. *J Virol*. (2019) 93:1–8. doi: 10.1128/JVI.00640-19
38. Zhang F, Wang H-I, Wang Q, Liu Z-Y, Yuan L, Huang X-Y, et al. American strain of Zika virus causes more severe microcephaly than an old Asian strain in neonatal mice. *EbioMedicine*. (2017) 25:95–105. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.10.019
39. Brahma R, Gurunathan S, Naorem LD, Mathaiyan M, Gopal J, Venkatesan A. Identification of hub genes and pathways in Zika virus infection using RNA-seq data: a network-based computational approach. *Viral Immunol*. (2018) 31:321–32. doi: 10.1089/vim.2017.0116
40. Singh PK, Khatri I, Iba A, Pletto CD, Spindler KR, Arumugawari V, et al. Determination of system level alterations in host transcriptome due to Zika virus (ZIKV) infection in retinal pigment epithelium. *Sci Rep*. (2018) 8:11209. doi: 10.1038/s41598-018-29529-2
41. Zairini F, Fu S-Y, Bekerman E, Einav S, Quake SR. Single-cell transcriptional dynamics of flavivirus infection. *eLife*. (2018) 7:e32942. doi: 10.7554/eLife.32942
42. Coyne CB, Lanasar HM. Zika virus—reigniting the TORCH. *Nat Rev Microbiol*. (2016) 14:707–15. doi: 10.1038/nrmicro.2016.125
43. Martinez RB, Bhatnagar J, de Oliveira Ramos AM, Dvor HPF, Iglesias SD, Kanamura CT, et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet*. (2016) 388:898–904. doi: 10.1016/S0140-6736(16)0883-2
44. Goutières F, Aicardi J, Barth PG, Lebon P. Aicardi-Goutières syndrome: An update and results of interferon-alpha studies. *Ann Neurol*. (1998) 44:900–7. doi: 10.1002/ana.410440608
45. Cuadrado E, Jansen MH, Azirik J, De Flippis L, Vescovi AL, Watts C, et al. Chronic exposure of astrocytes to interferon- $\alpha$  reveals molecular changes related to Aicardi-Goutières syndrome. *Brain: J Neurol*. (2013) 136:245–58. doi: 10.1093/brain/awt521
46. Akwa Y, Hausert DE, Ehrhardt ML, Sandberg K, Madhif E, Powell H, et al. Transgenic expression of IFN- $\alpha$  in the central nervous system of mice protects against lethal neurotropic viral infection but induces inflammation and neurodegeneration. *J Immunol*. (1998) 161:5016–26.
47. Campbell IL, Krucker T, Steffensen S, Akwa Y, Powell HC, Lane T, et al. Structural and functional neuropathology in transgenic mice

- with CNS expression of IFN- $\alpha$ . *Brain Res.* (1999) 835:46–61. doi: 10.1016/S0006-8993(99)01328-1
48. Crow YI. Type I interferonopathies: a novel set of inborn errors of immunity. *Ann New York Acad Sci.* (2011) 1238:51–8. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06220.x
49. Yockey LJ, Varda L, Rakib T, Khoury-Hanold W, Fink SI, Stutz E, et al. Vaginal exposure to Zika virus during pregnancy leads to fetal brain infection. *Cell.* (2016) 166:1247–56.e4. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.004
50. Yockey LJ, Izado KA, Arora N, Millet A, Rakib T, Milano KM, et al. Type I interferons invade fetal demise after Zika virus infection. *Sci Immunol.* (2018) 3:eaa01680. doi: 10.1126/sciimmunol.aao1680
51. Grant A, Poria SS, Tripathi S, Balasubramanian V, Miorin L, Sourisseau M, et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host Microbe.* (2016) 19:882–90. doi: 10.1016/j.chom.2016.05.009
52. Bowen JR, Quicke KM, Maddur MS, O'Neal JT, McDonald CE, Fedorova NR, et al. Zika virus antagonizes type I interferon responses during infection of human dendritic cells. *PLoS Pathog.* (2017) 13:e1006164. doi: 10.1371/journal.ppat.1006164
53. Yuan L, Huang X-Y, Liu Z-Y, Zhang H, Zhu X-L, Yu J-Y, et al. A single mutation in the p61 protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science.* (2017) 358:933–6. doi: 10.1126/science.1257120
54. Chindri L, Moura Fere S, Avvad-Portari E, Farias Meira Vasconcelos Z, Araújo Zin A, Prado Cunha D, et al. Persistence of Zika virus after birth: clinical, virological, neuroimaging, and neuropathological documentation in a 5-month infant with congenital Zika syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol.* (2018) 77:193–8. doi: 10.1093/jnen/nlx116
55. Brito CAA, Henriques-Souza A, Soares CRP, Castanha PMS, Machado LC, Pereira MR, et al. Persistent detection of Zika virus RNA from an infant with severe microcephaly—a case report. *BMC Infect Dis.* (2018) 18:388. doi: 10.1186/s12879-018-3313-4
56. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Sharp TM. Persistence of Zika virus in body fluids—final report. *New Engl J Med.* (2019) 380:198–9. doi: 10.1056/NEJMc1814416
57. Blank T, Deje CN, Spiels A, Hagemeyer N, Brendenke SM, Wolfart I, et al. Brain endothelial- and epithelial-specific interferon receptor chain 1 drives virus-induced sickness behavior and cognitive impairment. *Immunity.* (2016) 44:901–2. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.005
58. Padovan E, Spagnoli GC, Ferrantini M, Heberer M. IFN- $\alpha$ 2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8<sup>+</sup> effector T cells. *J Leukoc Biol.* (2002) 71:669–76. doi: 10.1189/jlb.71.4.669
59. van Heteren JT, Rozenberg F, Aronica E, Troost D, Lehen P, Kijpers TW. Astrocytes produce interferon- $\alpha$  and CXCL10, but not IL-6 or CXCL8, in Acicardi-Goutières syndrome. *Glia.* (2008) 56:568–78. doi: 10.1002/glia.20639
60. Gross JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol.* (2011) 89:207–15. doi: 10.1038/sb.2010.158
61. Tran PB, Barinade G, Ren D, Chen A, Miller RI. Chemokine receptor expression by neural progenitor cells in neurogenic regions of mouse brain. *J Comp Neurol.* (2007) 500:1007–33. doi: 10.1002/cne.21229
62. Sai Y, Potula R, Dhillon N, Finson D, Li S, Nath A, et al. Neuronal apoptosis is mediated by CXCL10 overexpression in simian human immunodeficiency virus encephalitis. *Am J Pathol.* (2004) 164:1557–66. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63714-5
63. Huang W-C, Abraham R, Shim B-S, Choe H, Page DT. Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. *Sci Rep.* (2016) 6:34793. doi: 10.1038/srep34793
64. Retallick H, Di Lullo E, Arias C, Knopp KA, Lazare MT, Sandoval-Espinosa C, et al. Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2016) 113:14408–13. doi: 10.1073/pnas.1618029113
65. Klok MD, Bakula HS, Postema NL, van Spaendonck RML, van der Knaap MS, Bagiani M. Interferon- $\alpha$  and the calcifying microangiopathy in Acicardi-Goutières syndrome. *Ann Clin Transl Neurol.* (2015) 2:774–9. doi: 10.1002/acn3.213
66. Assenio VC, Maier I, Milner I, Bortag K, Kincaid C, Moulard M, et al. Interferon-independent, human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated induction of CXCL10/IP-10 gene expression by astrocytes in vivo and in vitro. *J Virol.* (2001) 75:7067–77. doi: 10.1128/JVI.75.15.7067-7077.2001
67. Brownell I, Brackner I, Wagener I, Thomsen E, Loo Y-M, Gale M, et al. Direct, interferon-independent activation of the CXCL10 promoter by NF- $\kappa$ B and interferon regulatory factor 3 during hepatitis C virus infection. *J Virol.* (2014) 88:1582–90. doi: 10.1128/JVI.02007-13
68. Klein RS, Lin F, Zhang B, Luster AD, Tollett J, Samuel MA, et al. Neuronal CXCL10 directs CD8<sup>+</sup> T-cell recruitment and control of West Nile virus encephalitis. *J Virol.* (2005) 79:11457–66. doi: 10.1128/JVI.79.17.11457-11466.2005
69. Sai Y, Sachin-Hittal L, Li S, Loganathan R, Dhillon NK, Finson D, et al. CXCL10-induced cell death in neurons: role of calcium dysregulation. *Eur J Neurosci.* (2006) 23:957–64. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04631.x

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Lima, Meralonga, Renade, Correia, Arthal-Silva, Demers, D'Ásio, Wood, Chowdhari, Grifflin, Luconu-Araujo, Barbal-Neto, Anzede, Alves, Farias, Marques, Castanha, Donald, Kobi, Ningombkar and Franca. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.